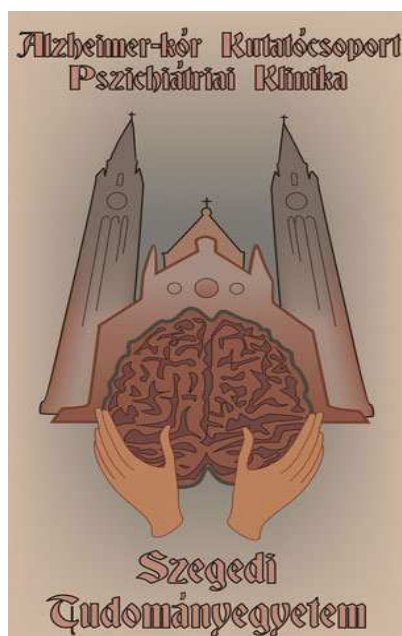

Magyar Tudományos Akadémia

Doktori Értekezés

Genomikai és metabolomikai eltérések Alzheimer-kórban és
kísérletes modelljeiben

Dr. Kálmán János



Szeged

2006

*Okos, aki érti az embereket;
aki önmagát érti: ihletett.
Hatalmas, aki másokat legyőz;
aki önmagát legyőzi: erős.
Aki törekszik: nincs híján akaratnak;
aki megelégszik: gazdag.
Aki nem veszti természetét: hosszúéletű;
aki nem veszti emlékezetét: örökéletű.
Lao-ce*

Tartalomjegyzék

Rövidítések és jelölések jegyzéke	6
Az ábrák jegyzéke	9
A táblázatok jegyzéke	10
Bevezető	13
Szubjektív bevezető	14
1. Tudományos háttér és kutatási előzmények	16
1.1. Az Alzheimer-kór és a demencia szindrómák epidemiológiája, gazdasági hatásai	16
1.2. Az Alzheimer-kór molekuláris és celluláris, patomechanizmusa, etiológiai hipotézisei	17
1.2.1. <i>Az Alzheimer-kór amiloid hipotézise</i>	18
1.2.2. <i>Az Alzheimer-kór örökletes formái és genetikai hipotézise</i>	21
1.2.3. <i>A kettős csapás hipotézis</i>	23
1.2.3.1. <i>A sejtsztódási ciklus zavara, sejthalál és az Alzheimer-kór</i>	23
1.2.3.2. <i>Az oxidatív stressz és az Alzheimer-kór</i>	24
1.2.4. <i>Az Alzheimer-kór koleszterin hipotézise</i>	26
1.2.4.1. <i>Az agyi koleszterin metabolizmus</i>	26
1.2.4.2. <i>Az apoE szerepe az Alzheimerkór kialakulásában</i>	30
1.2.4.3. <i>A szérum lipidek és az Alzheimer-kór</i>	33
1.2.5. <i>A genomikai vizsgálatok jelentősége az Alzheimer-kór kutatásában</i>	34
1.2.6. <i>A pszichofarmakonok hatása az APP anyagcseréjére</i>	35
2. Kutatási célkitűzések	37
3. Kutatási eredmények értékelő ismertetése	39
3.1. Az n-3 zsírsavakban gazdag halolaj diéta hogyan befolyásolja patkány agyi mikroerek membránjainak zsírsav összetételét és arachidonsav metabolizmusát?	39
3.2. Hogyan változtatja meg a magas koleszterin tartalmú diéta az AP-1 és NFκB transzkripció faktorok működését nyulak agyában?	42
3.3. Hogyan ha a magas koleszterin tartalmú diéta az APP metabolizmusára apoB transzgenikus egerek agyában?	46
3.4. A biglikán és az apoB izolált és közös expressziója transzgenikus egerekben hogyan hat az APP agyi transzkripciójára?	50
3.5. Milyen az AK betegek trombocitáinak membrán fluiditása és plazma MDA szintje?	52
3.6. Kimutatható-e az apoD az AK-os betegek agyában és ha igen, jelenléte kapcsolatba hozható-e a neurodegeneráció vagy az öregedés folyamatával?	55
3.7. Az apoE génjének polimorfizmusa milyen mértékű rizikótényező a magyar AK-os betegek esetében? E4-es alléljának öröklése rizikónak minősül-e más neuropszichiátriai betegségekben (VD, expresszív beszédfejlődési zavar)?	58

3.8.	Az apoE gén E4-es alléljának öröklése befolyásolja-e AK-os betegek szelegilin kezelésének kognitív változóit?	63
3.9.	Az apoE gén E4-es alléljának öröklése befolyásolja-e AK-os betegek kinurenin metabolizmusát a vérben?	65
3.10.	ApoE gén promoter régiójának -491A/T polimorfizmusa hogyan befolyásolja az AK rizikóját? Kimutatható-e interakció az apoE gén E4-es alléljának öröklése és a gén promoter régiójának polimorfizmusa között?	68
3.11.	A CYP46A1 enzim génjének T/C polimorfizmusa rizikónak minősül-e a magyarországi AK-os betegek esetében? Kimutatható-e interakció az apoE gén E4-es allélja és a 24(S)hidroxiláz gén C-allélja között?	70
3.12.	Hogyan változik az AChE enzim aktivitása AK-os betegek vérésejtjeiben? Az AChE milyen molekuláris formái fordulnak elő a vérésejtben? Vannak-e AK specifikus eltérések arányaikban? A BChE génjének K-allélja milyen gyakori a magyar AK-os betegek esetében? A BChE-K variáns génjének hordozása milyen kapcsolatban van az apoE gén E4-es alléljának öröklésével?	72
3.13.	Hogyan változik a szérum AChE és BChE enzimek aktivitása IIb típusú hiperlipidémiában? Van-e kapcsolat az apoE gén E4 alléljának öröklése és a ChE enzimek aktivitása között?	76
3.14.	Az oxidatív stressz milyen mértékű és jellegű DNS károsodást okoz különböző korú Down-kóros személyek limfocitáiban?	79
3.15.	Milyen mértékben fogékonyak az AK-os betegek limfocitái az UVB fény kiváltott apoptotikus sejthalálra?	84
3.16.	Milyen génextpressziós eltérések mutathatók ki az AK-os betegek limfocitáiban?	86
3.17.	Hogyan befolyásolják az antidepresszív szerek a központi idegrendszeri génextpressziót patkányban?	89
3.18.	Hogyan befolyásolják az antidepresszív szerek az APP metabolizmusát patkány agyban?	93
3.19.	Hogyan hat a szelektív szerotonin újrafelvétel gátló citalopram és a kombinált noradrenerg és szerotoninerger hatású mirtazapin az AK-os betegek limfocitáinak génextpressziójára?	97
3.20.	Hogyan befolyásolja a kevert noradrenerg és szerotoninerger hatású venlafaxin antidepresszívum kezelés az idős, pseudodemens személyek limfocitáinak génextpressziós mintázatát?	103
3.21.	Hogyan befolyásolják az antipszichotikumok a génextpressziót patkányok agyában?	107
3.22.	Hogyan befolyásolják az antipszichotikumok az APP agyi metabolizmusát patkányokban?	114
3.23.	Az addiktív szerek közül a 3,4-metiléndioximetamfetamin (MDMA) és a morfin krónikus adagolása hogyan befolyásolja az APP agyi anyagszerjét?	117
3.24.	Hogyan hatnak a benzodiazepinek az APP szintekre patkány agyban?	120
4.	A tudományos eredmények összefoglalása	123
5.	Az eredmények gyakorlati hasznosíthatósága	126
6.	A tudományos munka önkritikája	128
7.	A tézisek anyagát képező közlemények	133
8.	Köszönetnyilvánítás és az elnyert tematikus kutatási pályázatok listája	136
9.	Irodalomjegyzék	139
10.	Függelék	159

10.1. Módszertani összefoglaló	159
10.1.1. Vizsgálati személyek	159
10.1.1.1. Alzheimer-kóros és idős depressziós személyek kezelése pszichofarmakonokkal	160
10.1.2. Vizsgálati állatok	160
10.1.2.1. Állateteséses kísérletek	161
10.1.2.1.1. Halolaj diéta patkányokban	161
10.1.2.1.2. Koleszterin diéta nyulakban	161
10.1.2.1.3. Koleszterin diéta transzgenikus egerekben	161
10.1.3. Patkányok kezelése pszichofarmakonokkal	161
10.1.4. Agyi mikroerek tisztítása	162
10.1.5. Agyi membrán preparátumok készítése	162
10.1.6. Patkány bazális előagyi neuron tenyésztet készítése	162
10.1.7. Humán trombociták tisztítása vérből	163
10.1.8. Limfociták tisztítása vérből	163
10.1.9. Genomikai módszerek	163
10.1.9.1. ApoB-100 transzgenikus egerek előállítása	163
10.1.9.2. Biglikán transzgenikus egerek előállítása	164
10.1.9.3. Gén polimorfizmus vizsgálatok	164
10.1.9.3.1. Vérminták vétele, limfociták tisztítása és a DNS kivonása	164
10.1.9.3.2. ApoE polimorfizmus	164
10.1.9.3.3. ApoE -491 A/T promotor polimorfizmus	165
10.1.9.3.4. CYP46 T/C polimorfizmus	165
10.1.9.3.5. A BChE-K polimorfizmus	165
10.1.9.4. Az APP mRNS szintek meghatározása agymintákban	166
10.1.9.5. Gén expressziós profil vizsgálatok DNS chip módszerrel	167
10.1.9.5.1. Mérés és adatelemzés	168
10.1.9.5.2. QRT-PCR	168
10.1.9.6. Comet vizsgálat	169
10.1.9.6.1. A vizsgálat elméleti alapjai	169
10.1.9.6.2. A comet vizsgálat	169
10.1.9.7. Ultraibolya B sugárzás-kiváltott apoptózis vizsgálata limfocitákon	170
10.1.9.8. Áramlásos citofluorimetriás mérések	170
10.1.10. Biokémiai és immunhisztokémiai módszerek	171
10.1.10.1. APP és PKC szemikvantitatív meghatározása Western immunoblottal	171
10.1.10.2. Elektroforetikus mobilitási shift vizsgálatok (EMSA)	172
10.1.10.2.1. A nukleáris fehérje kivonat készítése	172
10.1.10.2.2. EMSA	172
10.1.10.3. AChE és BChE enzimek aktivitásának meghatározása	173
10.1.10.3.1. Az AChE enzim molekuláris formáinak szétválasztása	173
10.1.10.4. A vérplazma és az agyi membrán preparátumok malondialdehid tartalmának mérése	173
10.1.10.5. ApoD kimutatás Western immunoblottal	173
10.1.10.6. ApoD immunhisztokémia humán agymintákból	174

10.1.10.7. A vérplazma és a vvt-k KAT aktivitásnak meghatározása	174
10.1.10.8. A vérplazma és a vvt-k KIN és KINA tartalmának meghatározása	174
10.1.11. A lipid anyagcsere vizsgálómódszerei	175
10.1.11.1. A trombocita membránok fluiditásának meghatározása	175
10.1.11.2. Koleszterin és triglicerid szint mérések	175
10.1.11.3. Lipidek kivonása szövetmintákból	176
10.1.11.4. A konjugált diének és triének mennyiségének meghatározása	176
10.1.11.5. A zsírsavak analízise	176
10.1.11.6. Eikozanoidok szintézisének vizsgálata	176
10.1.11.6.1. Magas nyomású folyadék kromatográfia (HPLC)	177
10.1.12. Statisztikai módszerek	177
10.2. A doktori értekezés részét nem képező további közlemények listája	178
10.3. Tudománymetriai adatok, statisztikák	183

Rövidítések és jelölések jegyzéke

ACAT	acetilkoenzim A koleszterin aciltranszferáz	CO ₂	széndioxid
ACD	acid citrate dextróz	COX	ciklooxigenáz
AChE	acetilkolinészteráz	COX-2	ciklooxigenáz-2
ADAM	α-szekretáz	Cpm	count per minute
ADAS-Cog	Alzheimer's Disease Assessment Scale Cognitive Items	CREB	cAMP response element binding protein
AK	Alzheimer-kór	CT	komputer tomográf
ANOVA	variancia analízis	Cy3	3'-fluoreszcein
AP-1	aktivátor protein-1	Cy5	5'-fluoreszcein
apoAI	apolipoprotein AI	CYP46A1	citokróm P46A1 enzim
apoAIV	apolipoprotein AIV	DA	dopamin
apoB	apolipoprotein B	dATP	2'-deoxiadenozin 5'-trifoszfát
apoD	apolipoprotein D	dCTP	2'-deoxicitozin 5'-trifoszfát
apoE	apolipoprotein E	dGTP	2'-deoxiguanozin 5'-trifoszfát
APP	amiloid prekursor protein	DHA	dokozahexaénsav
APPmembr	membrán kötött APP	DK	Down-kór
APPsol	szolubilis APP	DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
ATF-2	activating transcription factor 2	DMSO	dimetil-szulfoxid
BACE	beta-site amyloid precursor protein cleaving enzyme	DNS	deoxiribonukleinsav
BAP	béta-amiloid peptid	dNTP	deoxi-nukleotid-trifoszfát
BChE	butirilkolinészteráz	DPH	1,6-difenil-1,3,5-hexatrién
BChE-K	butirilkolinészteráz K allél	DPH-PA	1,6-difenil-1,3,5-hexatrién-anion propionsav
BCIP/NBT	5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate/nitro blue tetrazolium	DPT	Diszlexia Prognosztikai Teszt
BDNF	agyi eredetű neurotrofikus faktor	DSM-IV	Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders - Fourth Edition
BNO-10	Betegségek Nemzetközi Osztályozása	DTPV	Developmental Test of Visual Perception
BZD	benzodiazepin	DTT	ditiotreitol
CAT	kataláz	dTTP	2'-deoxitimidin 5'-trifoszfát
cAMP	ciklikus adenzin-monofoszfát	ECM	extracelluláris mátrix
CERAD	Consortium to Establish a Registry for Alzheimer's Disease	EDTA	etilén-diamin-tetraacetát
cGMP	ciklikus guanozin-monofoszfát	EMSA	Electrophoretic Mobility Shift Assay
CD3	CD3 glycoprotein (T-cell surface protein)	Endo III	endonukleáz III
CD3G	CD3G gamma (gamma subunit of T3)	EPA	eikozapentaénsav
cDNS	komplementer deoxiribonukleinsav	EST	expressed sequence tag
C-fos	FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homologue	EU	Európai Unió
		FITC	fluoreszcein isotiocianát
		Fpg	formamidopirimidin DNS-glikoziláz
		GABA	γ-aminovajsav

CGI	Clinical Global Impression	GFAP	glial fibrillary acidic protein
CGIc	Clinical Global Impression change	GPO-PAP	gasztrikus peroxidáz-peroxidáz-
CGIs	Clinical Global Impression severity	GPX	glutathion peroxidáz
CI	konfidencia intervallum	H2AZ	hisztin (acetyl K11 + K4 + K7)
C-jun	v-jun avian sarcoma virus 17 oncogene homologue	NA	noradrenalin
HC	magas koleszterin diéta	NaCl	nátrium-klorid
HDL	high-density lipoprotein	Na ₂ EDTA	dinátrium-etilén-diamin-tetraacetát
		NaSSA	noradrenerg és szelektív szerotoninerg antidepresszívum
HEPES	N-(2-hydroxietyl)-piperazin-N'-2 etanolszulfonsav	NEN	NF-κB-kötő oligonukleotid
HETE	hidroxi-eikozatetraénsav	NF-κB	nukleális faktor κB
HHT	12-hidroxi-5,8,10- heptadekatriénsav	NFF	neurofibrilláris fonadék
3HK	3-hidroxi-kinurenin	NINCDS- ADRDA	National Institute of Neurological and Communicative Diseases and Stroke/Alzheimer's Disease and Related Disorders Association
HMG-CoA	3-hidroxi-3-metilglutaril coenzim A redukáz		
H ₂ O ₂	hidrogén-peroxid	NINDS-AIREN	National Institute of Neurological Disorders and Stroke/Association Internationale pour la Recherche et l'Enseignement en Neurosciences
HPETE	hidroperoxieikozatetraénsav	NK	natural killer
HPLC	high pressure liquid chromatography	NMDA	N-metil-D-aszparaginsav
HRP	horra peroxidáz	NO	nitrogén-monoxid
HSPG	heparán-szulfát-proteoglikán	NP	Niemann-Pick betegség
5HT	5-hidroxitriptamin/szerotonin	NP-40	nonidet-P40
IdLDL	intermediate-density low-density lipoprotein	NPC	Niemann-Pick betegség C típusa
		8-OHG	8-hidroxi-guanozin
IgG	immunoglobulin G	8-OHdG	8-hidroxi-2'-deoxiguanozin
JNK- SAPK	c-Jun-NH ₂ -terminal kináz – stressz- aktivált protein kináz	OH	hidroxil gyök
KAT I	kinurenin aminotranszferáz I	OR	odds hányados
KAT II	kinurenin aminotranszferáz II	OS	oxidatív stressz
KCl	kálium-klorid	PAP	peroxidáz-antiperoxidáz
KIN	kinurenin	p38-SAPK	p38 - stress activated protein kinase
KINA	kinurénsav	PBS	foszfát pufferelt só oldat
KIR	központi idegrendszer	PCR	polimeráz láncreakció
KT	kontroll	PG	proteoglikán
LDL	low-density lipoprotein	PGAM1	foszfogliceromutáz
LOX	lipoxigenáz	PGD-2	prostaglandin D2
LRP	lipoprotein receptor protein-related fehérje	PGE-2	prostaglandin E2
		PGF-1	prostaglandin F1
LSD	least-square-deconvolution	PGF-2	prostaglandin F2
LTP	long-term potentiation	PGI-2	prostaglandin I2
MD	major depresszió	PITP	phosphatidylinositol transfer protein
MDA	malondialdehid	PKC	protein kináz C

MDMA	3,4-metiléndioximetamfetamin	PMSF	fenil-metil-sulfonil-fluorid
MgCl ₂	magnézium-klorid	POPOP	feniloxazolil-benzén
MHC	major histocompatibility complex	PPO	polifenol oxidáz
M-MLV	Moloney murine leukemia vírus	QRT-PCR	quantitative reverse transcription polymerase chain reaction
MR	mágneses rezonancia		
mRNS	messenger ribonukleinsav	TCA	triklórecetsav
mSTI1	murine stress-inducible protein 1	Th	terápiás
QUIN	kvinolinsav	TMA-DPH	1-(4-trimetil-ammóniumfenil) -6-fenil-1,3,5- hexatrién
RANBPM	Ran-binding protein M		
RIP	human cell death protein (receptor- interacting serine/threonine-protein kinase 2)	TRAIL	TNF-related apoptosis inducing ligand
		TRIS-HCl	TRIS-hidroklorid
RNS	ribonukleinsav	TRP	triptofán
RP-HPLC	reversed phase high performance liquid chromatography	Tx	toxikus
		TXB-2	tromboxán B2
rpm	revolutions per minute	UV	ultraibolya
RT-PCR	reverz transzkriptáz polimeráz láncreakció	UVB	ultraibolya B
		UVC	ultraibolya C
SDC	nátrium deoxi kolát	XeCl	Xenon-klorid
SDS	nátrium dodecil szulfát	VAG	vér-agy gát
SNRI	szelektív noradrenalin és szerotonin reuptake inhibitor	V-ATP-áz	V-adenozintrifoszfátáz
		VD	vaszkuláris demencia
SNP	egypontos nukleotid polimorfizmus	VLDL	very low density lipoprotein
SOD	szuperoxid-dizmutáz	vvt	vörösvértest
SPECT	egyfoton emissziós komputer tomográfia	WHO	Egészségügyi Világszervezet
SSC	nátrium-klorid-nátrium citrát		
SSRI	szelektív szerotonin és noradrenalin reuptake inhibitor		
SzP	szenilis plakk		
SZTE	Szegedi Tudományegyetem		
TBAR	tiobarbitursav reaktív anyagok		
TC-199	tissue culture-199 medium		

A transzkriptomikai kísérleteink eredményeinek bemutatásakor a táblázatokban és néhány ábra esetben is szándékosan maradtak angol nyelvű kifejezések (gének, klónok nevei, néhány genetikai terminus technicus, fogalom, vegyületek nevei, rövidítések) a doktori értekezésben. Ezek lefordítását nem tartottam célszerűnek a doktori értekezés érthetősége, szakmai nyelvezete szempontjából. Magyar nyelvű fordításaik léteznek, de a szakmai nyelv kevésbé használja ezeket a fordításokat. Sajnos az angol szakzsargon használata terjedt el bizonyos esetekben ezeken a szakterületeken. A doktori értekezésemben, amennyire csak lehetett, anyanyelvem, a magyar megfelelő használatára törekedtem. A fordítási érthetőség nehézségei és a szakmai közérthetőség „egyszerűsítése” miatt vettem át bizonyos korlátozott számú esetben az angol kifejezések és rövidítések használatát.

Az ábrák jegyzéke

1. ábra. Az amiloid prekursor protein (APP) preferált tartózkodási helye a sejtmembrán koleszterin szegény régiói.
2. ábra A reaktív oxigén vegyületek sejtekben előforduló formái.
3. ábra A két legjobban tanulmányozott hidroxil szabad gyök oxidált DNS bázis termék. Guanozin: a guanin deoxiribóz származéka, dR, deoxiribóz; OH[•]; hidroxil gyök.
4. ábra A szabad gyökök keletkezése (O₂^{•-}, OH[•]) és az oxidatív stressz elleni védekező mechanizmusok.
5. ábra A sejtmembrán koleszterin tartalmának változása befolyásolja az APP kompartmentalizációját és metabolikus sorsát.
6. ábra A koleszterin eltávolításának lehetséges útjai a központi idegrendszerben. Az agyi koleszterin helyileg, de novo szintetizálódik acetyl CoA-ból.
7. ábra A neurogliális interakció révén a koleszterin újrahasznosul a központi idegrendszerben. A neurodegeneratív folyamat során az asztrociták fagocitálják az elpusztult sejtek törmelékét.
8. ábra APP/β-aktin hányadosok a kontroll (wild-type), humán apoB-100 transzgenikus (Tg /apoB^{+/+}) és koleszterin diétán (HC) tartott egerek agyában.
9. ábra A szolubilis (APPsol) és a membrán kötött (APPmembr) APP frakciók optikai denzitás értékei a kontroll (wild-type), humán apoB-100 transzgenikus (Tg (apoB^{+/+}) és koleszterin diétán (HC) tartott egerek agyában.
10. ábra Az apoD immunoblot a: humán szérumban, b: agykéregben, c: agyi ciszta folyadékban, d: likvorban, e: emlő ciszta folyadékban.
11. ábra Plazma és vörösvértest KAT I és KAT II aktivitások, KIN és KINA szintek.
12. ábra Az AChE enzim molekuláris formái a kontroll személyek vörösvértestjeiben, limfocitáiban és trombocitáiban.
13. ábra A DNS bázisok oxidatív DNS károsodását követő excíziós javító mechanizmusok.
14. ábra Imipramin és citalopram kezelés hatása az APP immunoreaktivitásra patkány bazális előagyi neuron tenyészetekben (E18DIV8), Western immunoblot kísérletek.
15. ábra Imipramin és citalopram kezelés hatása a szekretált APP izoformák mennyiségére patkány bazális előagyi neuron tenyészetek (E18DIV8) tápfolyadékában, Western immunoblot kísérletek.
16. ábra Imipramin és citalopram kezelés hatása a szekretált APP izoformák mennyiségére az idő függvényében. Patkány bazális előagyi neuron tenyészetek (E18DIV8) tápfolyadékában, Western immunoblot kísérletek.
17. ábra Imipramin és citalopram kezelés hatása a PKC immunoreaktivitásra patkány bazális előagyi neuron tenyészetekben (E18DIV8), Western immunoblot kísérletek.
18. ábra Akut (a) és krónikus (b) terápiás (Th) és toxikus (Tx) haloperidol kezelés hatása a kortikális APP szintekre patkány agyban. Szemikvantitatív Western immunoblot meghatározások.
19. ábra Akut (a) és krónikus (b) terápiás (Th) és toxikus (Tx) risperidon kezelés hatása a kortikális APP szintekre patkány agyban.
20. ábra A morfin és MDMA hatása a szolubilis és membrán kötött APP frakciókra a patkány agykéregben.
21. ábra A morfin és az MDMA hatása a BACE protein szintekre patkány agykéregben.
22. ábra Az APP mennyiségének változásai terápiás (Th) és toxikus (Tx) dózisú diazepam és midazolam adagolása után a patkány agykéregben.

A táblázatok jegyzéke

1. táblázat A különböző diétákon tartott patkányok agyi mikroereinek zsírsav összetétele.
2. táblázat A különböző diéták hatása a patkány agyi mikroerek arachidonsav metabolit összetételére.
3. táblázat A koleszterin diétán tartott nyulak vérplazma, máj és kortikális koleszterin tartalma.
4. táblázat Az oxidált lipid származékok mennyisége a koleszterin kezelt és kontroll nyulak vérplazmájában.
5. táblázat Az oxidált lipid származékok mennyisége a koleszterin kezelt és kontroll nyulak temporális agykéreg mintáiban.
6. táblázat Az AP-1 és az NFκB transzkripciós faktorok kötődési aktivitása koleszterin kezelt és kontroll nyulak temporális agykéreg nukleális fehérje kivonat mintáiban.
7. táblázat A koleszterin diéta hatása a PKC és BACE szintekre (optikai denzitás, OD) kontroll (wild-type), humán apoB-100 transzgenikus (Tg /apoB^{+/+}) és koleszterin diétán tartott egerek agyában.
8. táblázat Az APP695 és APP770 mRNA szintek a kontroll és humán biglikán transzgenikus /Tg (biglikán^{+/+})/, valamint kettős humán apoB-100 és biglikán transzgenikus /Tg (apoB^{+/+}, biglikán^{+/+})/ egerek agykérgében.
9. táblázat KT és AK-os betegek trombocita membrán preparátumainak fluoreszcens anizotrópia értékei.
10. táblázat Plazma malondialdehid (MDA) szintek a KT és AK-os betegek vérében.
11. táblázat Az apoE allélfrekvenciák megoszlása a beteg KT és AK-os személyeknél.
12. táblázat Az apoE genotípusok és frekvenciák megoszlása KT és VD-s személyeknél.
13. táblázat ApoE genotípusok és allél frekvenciák a KT és expresszív beszédfejlődési zavarban szenvedő gyermekeknél.
14. táblázat Az expresszív beszédfejlődési zavarban szenvedő gyermekek klinikai sajátosságai apoE alléltípusuk függvényében.
15. táblázat A szelegilin kezelt AK-os betegek demográfiai jellemzői az apoE E4-es allélt hordozó és nem hordozó személyeknél.
16. táblázat A szelegilin kezelt AK-os betegek apoE genotípus és allél frekvenciák gyakoriságai.
17. táblázat A vizsgált klinikai változók eltérései 48 hetes szelegilin kezelést követően az apoE E4-es allélt hordozó és nem hordozó AK-os személyeknél.
18. táblázat ApoE allél frekvenciák a KT és AK-os betegek csoportjában.
19. táblázat ApoE genotípus és allél frekvenciák az Alzheimer-kóros és kontroll csoportokban.
20. táblázat ApoE promotor -491A/T genotípusok és allél frekvenciák az Alzheimer-kóros és kontroll csoportokban.
21. táblázat ApoE promotor -491A/A genotípus gyakorisági megoszlása az apoE4 allélt hordozó és nem hordozó AK és KT személyeknél.
22. táblázat ApoE genotípusok és allél frekvenciák AK-ban és idős KT személyek esetében.
23. táblázat CYP46A1 genotípusok és allél frekvenciák AK-ban és idős KT személyek esetében.
24. táblázat A CYP46 gén C-alléljának és az apoE gén E4-es alléljának interakciója AK-ban és idős KT személyek esetében.

-
25. táblázat Az AChE molekuláris formáinak szedimentációs koefficiense az AK-os és KT személyek vörösvértestjeiben (V), limfocitáiban (L) és trombocitáiban (T).
26. táblázat Az AChE molekuláris formáinak (G2, G4, A12) százalékos megoszlása az AK-os és KT személyek vörösvértestjeiben, limfocitáiban és trombocitáiban.
27. táblázat ApoE genotípus és allél gyakoriságok a KT és AK-os populációkban.
28. táblázat A kontroll és hiperlipidémiás személyek szérumban lévő lipid értékei valamint AChE és BChE aktivitása.
29. táblázat ApoE genotípusok és allél frekvenciák a kontroll és hiperlipidémiás betegcsoportokban.
30. táblázat A szérumban lévő lipid szintek valamint AChE és BChE enzim aktivitások a különböző apoE genotípust hordozó személyeknél.
31. táblázat A szérumban lévő lipid szintek valamint AChE és BChE enzim aktivitások a különböző apoE gén E4-es és E2-E3 allélt hordozó személyeknél.
32. táblázat Az oxidatív DNS károsodás mértéke DK-os és KT személyek limfocitáiban (gyermek és felnőtt alcsoportok között).
33. táblázat Az oxidatív DNS károsodás mértéke DK-os és KT gyermekek limfocitáiban.
34. táblázat Az oxidatív DNS károsodás mértéke DK-os és KT felnőttek limfocitáiban.
35. táblázat Az UVB-indukált apoptózis mértéke kontroll és AK betegek limfocitáiban.
36. táblázat Az AK betegek limfocitáiban represszált gének listája.
37. táblázat Az AK betegek limfocitáiban fokozott mértékben expresszált gének listája.
38. táblázat Az akut (96 óra) (A) és krónikus (4 hét) (B) imipramin kezelés hatására a patkány agyban represszáldott gének listája és ismert funkciói.
39. táblázat Az akut (96 óra) (A) és krónikus (4 hét) (B) imipramin kezelés hatására a patkány agyban fokozott mértékben expresszáldott gének listája és ismert funkciói.
40. táblázat Az akut (96 óra) citalopram kezelés hatására a patkány agyban represszáldott gének listája és ismert funkciói.
41. táblázat A krónikus (4 hét) citalopram kezelés hatására a patkány agyban represszáldott gének listája és ismert funkciói.
42. táblázat Az akut (96 óra) (A) és krónikus (4 hét) (B) citalopram kezelés hatására a patkány agyban fokozott mértékben expresszáldott gének listája és ismert funkciói.
43. táblázat A citalopram kezelés hatására fokozott mértékben expresszáldott gének a KT személyek limfocitáiban.
44. táblázat A citalopram kezelés hatására fokozott mértékben expresszáldott gének az AK-os személyek limfocitáiban.
45. táblázat A citalopram kezelés hatására represszáldott gének az AK-os személyek limfocitáiban.
46. táblázat A mirtazapin kezelés hatására megváltozott mértékben expresszáldott gének listája a KT személyek limfocitáiban.
47. táblázat A mirtazapin kezelés hatására megváltozott mértékben expresszáldott gének listája a KT személyek limfocitáiban.
48. táblázat A venlafaxin kezelés hatására indukált gének listája.

49. táblázat A venlafaxin kezelés hatására represszált gének listája.
50. táblázat Az akut (96 órás) haloperidol kezelés hatására fokozott mértékben expresszáldott gének listája a patkány agykérgében.
51. táblázat Az akut (96 órás) haloperidol kezelés hatására represszáldott gének listája a patkány agykérgében.
52. táblázat A 4 hetes haloperidol kezelés hatására megváltozott mértékben expresszáldott gének listája a patkány agykérgében.
53. táblázat Az akut (96 órás) risperidon kezelés hatására fokozott mértékben expresszáldott gének listája a patkány agykérgében.
54. táblázat Az akut (96 órás) risperidon kezelés hatására represszáldott gének listája a patkány agykérgében.
55. táblázat A 4 hetes risperidon kezelés hatására fokozott mértékben expresszáldott gének listája a patkány agykéregben.
56. táblázat A 4 hetes risperidon kezelés hatására represszáldott gének listája a patkány agykéregben.
57. táblázat A diétában használt olajok zsírsav összetétele (a teljes mennyiség %-a).
58. táblázat Az RT-PCR és a QRT-PCR kísérletek primerei.

*Nem szép az őszinte szó,
nem őszinte a szép szó.
Nem ékes-szavú a jó,
az ékes - szavú nem jó.
A tudó nem beszél,
a nem-tudó beszél.
A bölcs nem gyűjt,
mindent az emberekért tesz,
és néki is jut;
mindent az embereknek ad
és néki is jut.
A természet út-ja
segít, nem sarcol.
A bölcs ember út-ja
használ nem harcol.
Lao-ce*

Bevezető

Az idén, azaz 2006-ban, doktori értekezésem beadásának évében lesz 100 éve, hogy 1906. november 3-án a Délnyugat-Németországi Pszichiáterek 37. Kongresszusán, Tübingenben, Alzheimer doktor beszámolt August D. betegének neuropszichiátriai és neuropatológiai sajátosságairól. Ettől az időponttól számíthatjuk az Alzheimer-kór történetének újkori fejezetét.

A centenáriumi évforduló tekintélyt parancsoló, visszatekintésre, összegzésre és ünneplésre sarkall. Ilyen évforduló előestéjén az ember szinte ösztönösen hátradől a karosszékekben és elgondolkodik, mit sikerült megtudnunk a KÓR-ról 10x10 év alatt? Egy száz éves visszatekintés a hosszú és jól végzett munka elégedettségét sugallhatja, de kérdés, hogy van-e jogunk az elégedettségre?

Mondhatjuk azt 100 év után, hogy tudjuk mi az Alzheimer-kór? Egyetlen betegségről van egyáltalán szó, vagy többről? Tudjuk, hogy mi, és hogyan okozza? Fel tudjuk időben ismerni? Meg tudjuk előzni? Tudjuk gyógyítani? Tudjuk a tüneteit enyhíteni, a folyamatát lassítani? Mit, mennyit, és hogyan tudunk a családoknak, ápolóknak segíteni? A tömör és rövid választ ezekre a kérdésekre nehéz szívvel írni ide a papírra az ember. Lehet, hogy hasonló kérdések foglalkoztatták Alzheimer doktort is előadásának előestéjén?

Ha saját portánkon nézünk szét, és a magyarországi 100 évet tekintjük, elégedettek lehetünk-e azzal, amit elértünk? Tudjuk hány Alzheimer-kóros, és más demens beteg van országunkban? Felismerjük a betegeket? Segítünk nekik? Elérhető számukra a segítség? Képviseljük a betegek és családjuk érdekeit? Támogatjuk a hazai Alzheimer-kórral kapcsolatos kutatást és szakemberképzést? És még lehetne folytatni a kérdések özönét.

Doktori értekezést készíthetünk, a centenáriumot megünnepelelhetjük, de elégedetten hátradőlni ennyi kérdéssel, intéznivalóval nem lehet, mert ott van folyamatosan a nyomunkban a SZÁZ ÉV TALÁNY...

Szubjektív bevezető

Az Alzheimer-kór és a demenciák problémájával középiskolás koromban találkoztam először, és már ez az első találkozó is túlságosan személyesre sikeredett. Egyetlen élő nagymamám, Gy. M. akivel általános iskolai vakációim legszebb heteit töltöttem, ebben az időszakban kezdett egyre feledékenyebbé válni, fokozatosan képtelen lett a háztartási teendők ellátására, és hónapokkal később már nagyapám türelmes segítsége sem volt a helyzetben elegendő. A család háziorvos barátja érzelmeszedést, aggkori leépülést diagnosztizált és értágítókat, keringést javító Cavintont írt fel. Családunk nehéz döntés elé került. Mivel háziápolót nem tudtunk fogadni, a nagyfi két lánya, egyikük édesanyám, megegyezett, hogy fél éves fizetés nélküli szabadságokat vállalva felváltva, saját otthonában fogják ápolni. Ez a helyzet számomra fél éves anyai távolléteket jelentett, ennek minden hátrányával. Később a nagyfi már senkit sem ismert meg a családból, ágyhoz kötötté vált és a helyzetet illetően már csak neki volt jókedve a családban. Mikor táplálási és inkontinencia problémák jelentkeztek, krónikus elfekvő osztályra kellett elhelyezni a szegedi alsóvárosi templom kolostor részében, mely abban az állapotában a középkori ispotályok hangulatát és szagát idézte. Itt szegyenemre mondván csak egyszer látogattam meg. Aztán már csak a temetésére mentem el 1980-ban. Mai fejjel visszaemlékezve tüneteire, betegsége lefolyására nem kell neuropatológiai megerősítés, hogy tudjam, Alzheimer-kóros volt.

1985-ben elvégeztem a Szegedi Orvostudományi Egyetemet és a Pszichiátriai Klinikára kerülve, Janka Zoltán adjunktus úr két gyakori betegség és kutatási téma közötti választást javasolt. Az egyik lehetőség a depresszió és szuicidum vizsgálata lett volna, a másik pedig a demenciák és az Alzheimer-kór...

Már megvédtem a Ph.D. értekezésemet, melyet az Alzheimer-kór kísérletes immun állatmodelljének vizsgálatából készítettem, és már a Memória ambulancia vezetőjeként dolgoztam, mikor édesanyám elesett, és a következményes combnyaktörés miatt megoperálták. A műtétet követően vettük észre, hogy hangulata nem a régi, egyre jobban felejt, és visszahúzódó, kevésbé beszédes. Mivel az ismételt esések kockázata továbbra is fennállt, és napközben sem volt önellátásra képes annak ellenére, hogy közös háztartásban élt velünk, be kellett látnunk, hogy mivel napközben nincs otthon senki, nem tudjuk biztonságos életvitelét segíteni, ezért közösen megbeszéltük, hogy idősek otthonába költözik. Azóta is a gyakori telefonok ellenére csak havonta tudjuk meglátogatni, de az ünnepeket mindig velünk és unokáival közösen tölti. Annak ellenére, hogy tudjuk, hogy jó helyen van és a legjobb ellátást, segítséget kapja folyamatosan,

bánt és fáj, hogy nem élhet köztünk, és büntudatom van. Ezt tovább nehezíti, hogy ő is sokszor megfogalmazza, nem érzi ott jól magát. Most donepezilt és hangulatjavítókat szed, a koponya CT pedig közepes fokú kortikális és szubkortikális atrófiát igazolt a kamraszarvak körüli multiplex vaszkuláris léziókkal... Amikor meglátogatom, mindig elmondja, hogy szeretne ott lenni a doktori értekezésem védésén. Két nővérem van, és apolipoprotein E genotípusom szerint egy darab E4 allélt is örököltem...

*Nem lép ki az ajtón
és világot megismer,
nem néz ki az ablakon
és égi út-at megismer;
mennél messzebb megy,
annál kevesebbet ismer.
Ezért a bölcs
nem jár, hanem megismer,
nem néz, hanem megnevez,
nem cselekszik, hanem végbevisz.
Lao-ce*

1. Tudományos háttér és kutatási előzmények

1.1. Az Alzheimer-kór és a demencia szindrómák epidemiológiája, gazdasági hatásai

Az AK a leggyakoribb demenciához vezető neurodegeneratív betegség a világon és ezért a XX. század csendes járványának tartják. A Delphi konszenzus vizsgálat eredményei szerint 24-25 millió demens ember él napjainkban a világon (Ferri és mtsai 2005). Évente 4-6 millió új esetet ismernek fel, minden hetedik másodpercben egyet. Az előrejelzések szerint a demenciában szenvedők száma minden 20 évben meg fog duplázódni és az újonnan diagnosztizált esetek többsége a fejlődő országokban fordul majd elő (2040-re 71% lesz arányuk). Az amúgy is túlnépesedett ázsiai országokban például 300%-os előfordulási növekedés prognosztizált.

Az idősök várható életkilátásai Magyarországon jóval rosszabbak a nyugat-európai mutatóknál, hiszen annak valószínűsége, hogy egy férfi túléli a 65. életévét, hazánkban ma csupán 59%, míg ez az arány Ausztriában 80% (Kopp 2002; Kovács 2003). A középkorú nők idő előtti halálózása is háromszor magasabb Magyarországon, mint az európai átlag. A kedvezőtlen halálózási mutatók ellenére más európai országokhoz hasonlóan Magyarországon is folyamatosan nő a 65 év felettiek részaránya a teljes populációban.

A már korábban említett Delphi konszenzus vizsgálat becslései szerint (hiszen kelet-európai demencia epidemiológiai vizsgálat még nem történt), a demens betegek száma Kelet-Európában a 2001-ben becsült 1.8 millió főről 3.2 millióra fog emelkedni 2040-re, azaz 84%-os növekedési ütem várható (Ferri és mtsai 2005).

Az AK-ral kapcsolatos nemzetközi epidemiológiai adatokat alkalmazva Magyarországra, hazánkban 160 ezer ilyen beteg feltételezhető 2 millió 65 év feletti idős emberre vonatkoztatva (Tariska 2000a).

A demens betegek számának növekedése már ma is gazdasági, politikai tényező, a továbbiakban pedig a világgazdaságot befolyásoló problémává válik. A WHO 2003-as adatai szerint a 60 év felettiéknél az összes rokkantsági állapotban eltöltött idő 12%-át demencia betegségek és ezzel kapcsolatos problémák okozzák. A demens betegek intézeti ápolásának költségei Nagy-Britannia éves bruttó nemzeti termékének 0.6%-át képezi például. Hasonló magyarországi adatokkal sajnos nem rendelkezünk, ezért kénytelen vagyok más országok adataira, illetve nemzetközi mutatókra hivatkozni.

Az AK betegek ellátási adatait áttekintve az EU 2005-ös összefoglaló értékelése rámutat, hogy Magyarországon csak az AK betegek 2.8%-a jut a korszerűnek mondható farmakoterápiákhoz, szemben más EU országok 30-50%-os arányaival.

Összefoglalva azt mondhatjuk, hogy a társadalom öregedése és az ezzel járó demencia szindrómák világméretű egészségügyi, gazdasági és politikai problémákat okoznak. Az AK-ral, mint komplex genetikai betegséggel kapcsolatos problémák nagysága arra kell, hogy ösztönözze a kutatókat, hogy megtalálják rizikótényezőit, megismerjék patogenezisét, klinikai jellemzőit, és ezek alapján hatékony prevenciók, diagnosztikus és terápiás javaslatokat dolgozzanak ki (Uhl és Grow 2004). A „száz év talány” betegsége azonban továbbra is megoldatlan, és rengeteg feladatot ad és fog adni vizsgálóinak.

1.2. Az Alzheimer-kór molekuláris és celluláris patomechanizmusa, etiológiai hipotézisei

Annak ellenére, hogy az AK neurobiológiájával és klinikumával kapcsolatos ismereteink jelentősen bővültek az utóbbi 20 évben, kialakulásának patofiziológiáját és okát még nem ismerjük. Átfogó modell, teória több is ismert kialakulását illetően, és ezek változatossága tudásunk hiányosságait bizonyítja (Tariska 2000b).

A legfontosabbakat és legismertebbeket említve például, napjainkban is elfogadott és tudományos bizonyítékokon alapuló a kolinerg elmélet, amely összefügg a növekedési faktorok hiányán alapuló hipotézissel, az oxidatív stressz elmélet, a sejthalál teória, a sejtciklus zavarának hipotézise, a gyulladásos hipotézis, a glükóz anyagcsere zavarának teóriája, az agyi perfúziós zavar hipotézise, a glutamát anyagcsere zavarának/excitotoxikus hipotézise, a koleszterin-lipid anyagcsere zavarának elmélete, az amiloid hipotézis, genetikai teóriák (Rajna és Tariska 2000; Tariska 2000a). Ezeket mai ismereteink szerint a „kettős csapás” elmélet integrálja a legsikeresebb módon, és ez tekinthető a legújabbnak is (Zhu és mtsai 2004a,b). Ez a megközelítés genetikai és epigenetikai faktorok láncolatát fűzi fel és magában foglalja a sejtosztódási zavar és oxidatív stressz elméleteket. A koleszterin és lipid anyagcserezavar elmélete, az oxidatív stressz, valamint a genetikai teóriák is tárgyalásra kerülnek azonban doktori értekezésemben. Ennek kettős oka van. Egyrészt az értekezésem tárgyát képező kutatási munkák ezekhez kapcsolhatók elsősorban, másrészt ezek szorosan összefüggnek és mintegy alapját képezik a kettős csapás és sejtosztódási zavar teóriáknak is.

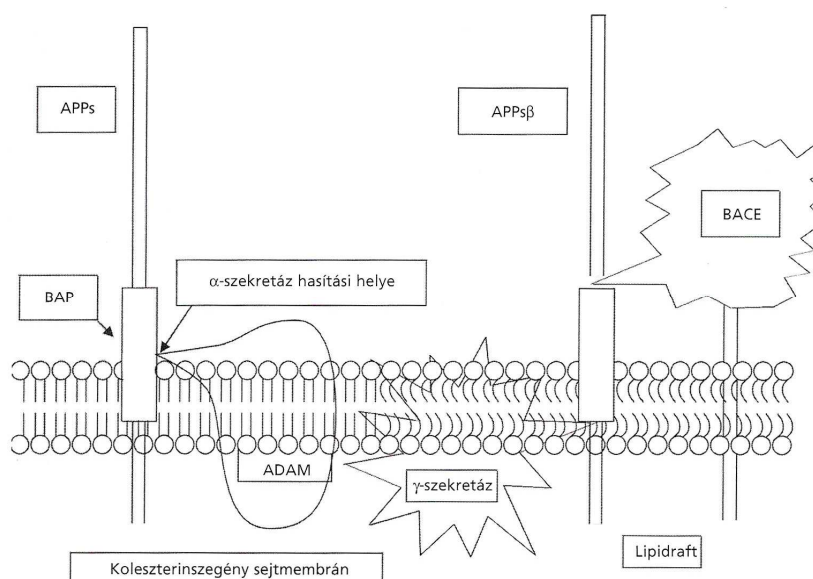
Az említettek közül az amiloid hipotézis, akár mint kiváltó ok, akár mint végső közös út (Hardy és Gwinn-Hardy 1998) szerepel szinte az összes többi megközelítés részeként, továbbá ezzel a teóriával kapcsolatosan rendelkezünk a legtöbb klinikai és experimentális bizonyítékkal is (Hardy és Selkoe 2002), ezért a továbbiakban elsőként és legrészletesebben az AK amiloid elméletét tárgyaljuk.

1.2.1. Az Alzheimer-kór amiloid hipotézise

Az AK betegek agyában szövettanilag a kortikális és bazális előagyi neuronok pusztulása, és a glia sejtek aktivációja mutatható ki, és az érintett sejtek károsodásából, pusztulásából eredően a szinaptikus kapcsolatok száma is csökken. Szövettanilag az AK-t az érintett területeken az extracelluláris amiloid depozitumok lerakódása, azaz a szenilis plakkok különböző formái, valamint az intracellulárisan felhalmozódó hiperfoszforilált tau proteinből képződő, kezdetben intracelluláris, később a sejtek pusztulásával extracellulárisrá váló aggregátumok neurofibrilláris fonadékok formájában történő lerakódása látható. A betegség harmadik neuropatológiai sajátossága a vaszkuláris amiloid depozitumok kialakulása az agyi erekben.

Az amiloid vagy SzP-k többségében az APP kóros hasításából keletkező 40-42 aminosavból álló peptid, BAP és más fehérjék, sejtek és sejttermékek aggregátumaiból képződnek. A BAP az AK betegek agyában a temporo-parietális cortex neuropiljében kialakuló szenilis plakkok fő komponense (Selkoe 1994). Kialakulása egy előfőhőre, az amiloid prekursor protein (APP) kóros alternatív poszt-transzlációs processzingjének következménye. Ez a folyamat és bizonyítékai képezik az AK amiloid kaszkád hipotézisét, amely a legelfogadottabb az ismeretlen eredetű betegség etiológiáját illetően (Hardy és Higgins 1992).

A hipotézis centrális axiómája szerint a 21-es kromoszóma hosszú karján elhelyezkedő APP génről átíródó APP695, APP751 és APP770 mRNS-ekből keletkező fehérje izoformák mind tartalmaznak a BAP domént, a heparin kötő és proteáz inhibitor szekvenciák mellett. Normál esetben, a szekretoros processzing során a membrán integráns APP izoformákat az alfa-szekretáz enzim a BAP domén Lys és Leu aminosavainál hasítva, autoaggregációra és toxicitásra nem hajlamos szolubilis fragmensekké alakítja (Haass és Selkoe 1993). Az endoszomális, lizoszomális APP processzing kóros formáiban (ilyenek a ritka familiáris AK formák is) nem az alfa, hanem a béta és gamma szekretázok egy 40-42 aminosavból álló amiloidogén peptideket hasíthatnak ki az APP transzmembrán régiójából (Maruyama és mtsai 1991), mely hidrofób sajátossága és szekvenciája miatt béta-lemezes struktúrává alakulhat (BAP), és proto- valamint valódi fibrillumokat képezve fehérje aggregátumok formájában rakódhat le az AK betegek központi idegrendszerében a sejtek degenerációját okozva (Howlett és mtsai 2000). Az APP poszt-transzlációs processzingjének harmadik lehetséges útja során a BAP fragmensek szolubilis formákban szekretálódnak (Haass és mtsai 1992) és ezekre a peptidekre jellemző, hogy neuronális trofikus hatásuk van (Selkoe 1994).



1. ábra Az amiloid prekursor protein (APP) preferált tartózkodási helye a sejtmembrán koleszterin szegény régiói (az ábra bal oldala). Itt az ADAM enzimkomplexbe tartozó alfa-szekretáz enzim hasítja, és szolubilis, nem amiloidogén fragmensek keletkeznek. Kóros esetben olyan koleszterin gazdag lipid raftokba kerülhet (ábra jobb oldala), ahol a béta és gamma-szekretázokkal találkozva (ezek mindig a raftokban találhatóak), az amiloidogén BAP hasítódik ki az APP-ből.

A lassan, évtizedekkel a betegség klinikai tüneteinek megjelenése előtt elinduló és progrediáló amiloid depozícióval párhuzamosan a szinaptikus kapcsolatok száma is fokozatosan csökken, mely egy kritikus mértéket meghaladva az AK kardinális klinikai tüneteinek megjelenéséhez vezet, azaz tanulási nehézséget, figyelemzavart, hangulati és viselkedési tüneteket okoz (Rajna és Tariska 2000; Tariska 2000a,b).

Az APP-ről tudjuk, hogy egy membrán integráns protein, mely egy nagy extracelluláris régióból, egy transzmembrán hélixből, és egy rövid citoplazmatikus farokrészből épül fel. Az APP N-terminális fele egy heparinkötő egységet tartalmaz egy proteázgátló szakasz mellett. Az APP N-terminális felének szerkezete arra utal, hogy feltételezhetően egy cisztein gazdag növekedési faktor fehérje szupercsalád tagja és feltételezhető heparin kötőhellyel is rendelkezik. A molekula rézkötő egysége szerepet játszhat a dimerizációs és proteolitikus folyamatban a fehérje poszt-transzlációs processzingje során. Azt is feltételezhetik, hogy a rézkötő domén ion-transzporterként is funkcionál.

Ma már tudjuk, hogy a BAP kialakításáért az APP proteolitikus hasítása a felelős (1. ábra). Mind a 40, mind a 42 aminosavból álló BAP variánsok részleges helikális struktúrát mutatnak. Konformációjuk függ mikrokörnyezetüktől, az ebben található ionoktól, pH-tól, és a membránok fiziko-kémiai sajátosságaitól. A BAP képes Cu^{2+} , Fe^{2+} és Zn^{2+} ionok megkötésére három hisztidin aminosava /His 677, His 684, His 685/ segítségével és egy tirozin /Tyr 681/ aminosav komponense is részt vehet az említett fémionok kötésében. Abban az esetben, ha a BAP fémionokat köt meg, megváltozik konformációja, béta lemezes szerkezete alakul ki, mely autoaggregációra hajlamossá teszi. Az AK amiloid hipotézisének másik axiómája a BAP

toxicitása, hiszen számos kísérlet igazolta, hogy ez a molekula a sejtek Ca^{2+} anyagcseréjének, mitokondriális funkcióinak közvetlen károsításával (Kaneko és mtsai 1995), vagy a sejtek excitotoxikus, oxidatív stressz, vagy hipoxia iránti toleranciájának csökkentésével közvetve járul hozzá a neuronok pusztulásához.

Már itt fontos megemlíteni, hogy mivel az APP egy transzmembrán protein, kompartmentalizációját a sejtmembrán koleszterin tartalma befolyásolja (1. ábra). Jelenlegi ismereteink szerint két fő APP lokalizáció ismeretes: egy membrán rafton kívüli és egy rafton belüli (Bouillot és mtsai 1996; Morishima-Kawashima és mtsai 1998; Parkin és mtsai 1999). Normál esetben fiziko-kémiai tulajdonságainál fogva az APP preferálja a rafton kívüli, koleszterinben szegény membrán doméneket. Mivel az alfa szekretáz is itt fordul elő, ezért a szolubilis, nem toxikus, amiloidogén APP izoformák keletkezhetnek (Mizuno és mtsai 1999; Kakio és mtsai 2001). Minden olyan folyamat, amely az APP kompartmentalizációs preferenciájának változásához vezet, elősegíti tehát, hogy a raftokba kerüljön és az ott található béta- és gamma szekretázok hasítsák, azaz az AK specifikus amiloidogén utat segíti (Simons és mtsai 1998; Lee és mtsai 1998; Frears és mtsai 1999). A két, rafton belüli és kívüli kompartment, és az ezekbe beépült szekretázok vetélkednek a meglévő APP készletekért a membránban, és ennek megfelelően vagy amiloidogén, vagy nem amiloidogén kaszkád mechanizmus indul be, amely elkerülheti az AK kialakulását, vagy éppen oda vezet. Ennek megfelelően minden olyan beavatkozás, amely az APP rafton kívüli metabolizmusát segíti, hatékony lehet az AK kialakulása szempontjából (Escriba 2006) (1. ábra).

Az APP fiziológiai szerepe még nem teljesen ismert. Erről a szekvenciáját tekintve filogenetikusan nagyon konzervatív molekuláról feltételezik, hogy glikozilált sejtfelszíni receptor (Kang és mtsai 1987) és hogy receptor funkciójából eredően mediálhatja a BAP toxicitását is (Lorenzo és mtsai 2000). Arra vonatkozóan is vannak bizonyítékok, hogy az APP-nek szerepe van az idegrendszer fejlődési, érési folyamataiban, a szinaptikus kapcsolatok és funkciók, plaszticitás fenntartásában (Kirazov és mtsai 2001). Az APP a koleszterin transzportjában és metabolizmusának regulációjában is szerepet játszik (Yao és Papadopoulos 2002). Ez a hatása összefügghet azzal, hogy stressz-válasz fehérjének is tartják, továbbá a neuronális regenerációs folyamatokban is részt vesz (Panegyres 2001). Még mindig nem bizonyított a kérdés azonban, hogy valóban a SzP-k és az amiloid okozzák-e az AK-t, vagy csak jelként arról árulkodnak, hogy különböző hatásmechanizmusú KIR-i károsító tényezők végső közös útként amiloid depozíciót okoznak az agyban. Annak ellenére, hogy az amiloid hipotézis a jelenleg ismert legátfogóbb magyarázat, mely többé-kevésbé sikeresen integrálja az AK többi, már korábban említett más hipotézisét, mégis számos gyenge pontja van, és sok vizsgálati eredmény szól ellene is:

1. Az AK esetek többsége nem genetikai forma, hanem sporadikus, tehát az epigenetikus

faktoroknak döntő szerepe lehet az esetek többségében (Singleton és mtsai 2004).

2. Az SzP-k nem demens emberek agyában is előfordulhatnak.
3. A BAP önmagában nem feltétlenül toxikus (Crystal és mtsai 1988). Számos kísérleti eredmény utal arra, hogy nem a fibrilláris BAP, hanem inkább a szolubilis oligomerek toxikusak, és károsítják a szinaptikus plaszticitást (Walsh és mtsai 2002).
4. Az AK amiloid hipotézisének másik gyenge pontja, hogy a szenilis plakkok száma nem korrelál a demencia súlyossági fokával. Újabb megfigyelések arra utalnak, hogy a szinaptikus kapcsolatok számának csökkenése és a szinaptikus sérülések kialakulása jóval megelőzik az amiloid protofibrillumok és oligomerek kialakulását, és a betegség korai jelének tekinthetők. Az érett plakkok csak a betegség késői stádiumában alakulnak ki és okoznak neuronális zavarokat.
5. Az amiloid hipotézis révén a tau patológia csak nehezen magyarázható. A NFF-ok, mint neuropatológiai jelek, önmagukban nem diagnosztikusak az AK szempontjából más neurodegeneratív betegségben, pl. szubakut szklerotizáló pánenkefalitiszben, progresszív szupranukleális bénulásban is kimutathatóak.

Végül fontosnak tartom megemlíteni, hogy egyre több bizonyítékkal rendelkezünk azonban arra vonatkozóan, hogy kóros, vagy kórosan aggregálódott fehérjék, protofibrillumok kialakulása, proteoszomális diszfunkció, ubikvitinizációs zavar, excitotoxikus károsodás, oxidatív- és NO-mediált stressz, mitokondriális működési zavarok, szinaptikus károsodás, az axonális és dendritikus transzport zavara, nyomelemek anyagcseréjének zavara, és számos más genetikai és epigenetikai tényező mind-mind részt vesznek az AK kialakításában.

1.2.2. Az Alzheimer-kór örökletes formái és genetikai hipotézise

Ha az AK-t genetikai szempontból vizsgáljuk, feltételezhető, hogy komplex öröklődésű betegség, vagy inkább betegségcsoport, hiszen örökletességi rizikója a különböző tanulmányok szerint 0.2-0.75 között van (Raiha és mtsai 1996; Gatz és mtsai 1997; Bergem és mtsai 1997). Mono- és oligogénes öröklődésű, és feltételezhető poligénes változatai különböztethetők meg, melyek kialakulását, lefolyását még korai pre- és posztnatális, valamint késői, korral járó környezeti kockázati tényezők is módosíthatnak. Az AK esetében tehát az oki, determinisztikus és rizikógének, és környezeti faktorok kölcsönhatása nagyfokú genetikai komplexitásban valósul meg (Juhász és mtsai 2003). Ennek pontos részleteit sajnos éppen a leggyakoribb, az előforduló esetek 80-98%-át (különböző becslések szerint) kitevő késői, 65 év felett kezdődő, sporadikus formák esetében ismerjük legkevésbé (Singleton és mtsai 2004).

Az AK neurogenetikájával kapcsolatos egyik fő probléma, hogy a feltételezett patomechanizmusban nehéz elkülöníteni a feltételezett oki és a másodlagos eseményeket. A ritka,

klasszikus mendeli öröklésmentet mutató mutációk okozzák az AK korai kezdetű familiáris formáit, és ezek a genetikai variánsok segítettek abban, hogy jobban megismerhessük az AK kialakulásának előzményeit és folyamatát, bár a neurodegeneratív folyamat pontos patomechanizmusa máig sem ismert.

Másrészt, az AK rizikógénjei esetében ismert, hogy az egyes gének kisebb hatást gyakorolnak a betegséggel kapcsolatos egyéni génkarrierre. A helyzetet bonyolítja, hogy a rizikógének hatása nem feltétlenül közvetlen. Lehet, hogy csak a betegség kialakításában részt vevő fehérjék anyagcseréjét módosítják közvetve. A rizikógén variánsoknak a feltérképezése, hatásuk megismerése, a környezeti befolyásoló faktorokkal való interakciójuk és hatásuk mértékének felderítése sokkal nehezebb feladatnak bizonyult eddig is és a továbbiakban is, mint a determinisztikus gének szerepének tisztázása az AK patomechanizmusában (Uhl és Grow 2004; Palotás és Kálmán 2006). Az említett szempontok alapján az AK általános örökletességét 0.53, mendeli öröklésmentét 0.02-re becsülik (Uhl és Grow 2004). Összehasonlításként említve, hogy a Huntington-kór esetében 1.00; 1.00 és a szkizofrénia esetében pedig 0.70; 0.02 ezek a viszonyszámok.

Az autoszóm domináns öröklésmentet mutató familiáris AK formák ritkák, és jelenlegi tudásunk szerint három gén pontmutációi okozhatnak ilyet:

1. *Az amiloid prekursor protein génjének pontmutációi:* Ezek az összes AK eset kevesebb, mint 2%-áért felelősek. Az APP mutációk esetében például alig egy tucatnyi család ismeretes a világon. Felismerésük azért nagy jelentőségű, mert minden esetben fokozott mértékű amiloid lerakódást eredményeznek és így fontos szerepük volt az AK amiloid hipotézisének kialakításában. Mivel DK-ban a 21-es kromoszóma triszómiája vagy transzlokációja fordul elő, és az APP gén is ugyanezen a kromoszómán helyezkedik el, az APP gén extra kópiája azzal jár, hogy ezek a személyek már akár a harmincas éveikben az AK klinikai és neuropatológiai tüneteit mutatják. Ezért a DK az AK egyik genetikai formájának is tekinthető és fokozott kutatási figyelmet kap (Zana és mtsai 2006a,b).
2. *Preszenilin 1-es és 2-es enzimek génjeinek pontmutációi:* Ezek a gének a 14-es és 1-es kromoszóma hosszú karján helyezkednek el, és ötvennél több pontmutációjuk korai, akár 35 év alatt induló AK-t okoz teljes penetranciával.
3. *Az apoE4 allél, mint genetikai rizikótényező:* A 19-es kromoszóma hosszú karján elhelyezkedő apoE molekula E4-es alléljának öröklése rizikótényezőnek minősül mind a sporadikus, mind az autoszóm domináns öröklésmentű AK formák esetében és hatással van az amiloid depozitumok és az NFF-k kialakulásának minőségi és mennyiségi sajátosságaira (Kálmán és Janka 1996a; Kálmán és mtsai 2000b; Kálmán és Janka 2005a; Palotás és Kálmán 2006). Az ApoE polimorfizmus molekuláris-celluláris hatásait az AK kialakulása

szempontjából a koleszterin-lipid hipotézis fejezetben tárgyalom részletesen.

1.2.3. Kettős csapás hipotézis

A kettős csapás hipotézis megalkotója Smith és munkacsoportja volt (Zhu és mtsai 2004b). Magyarázatuk szerint mind az oxidatív károsodás, mind a neuronok kóros mitotikus sejtosztódási ciklusa kezdő eseményként önmagában, majd később egymás hatását kiegészítve, felerősítve indítja el az AK molekuláris patomechanizmusát (Casetta és mtsai 2005; Ueberham és Arendt 2005). Posztulátumuk szerint mindkét folyamat szükséges az AK kialakulásához (Zana és mtsai 2006). Ezt a megközelítést integratív jellege miatt tartom fontosnak megemlíteni értekezésemben, mivel génexpressziós vizsgálataink eredményei több szempontból is igazolják.

1.2.3.1. A sejtosztódási ciklus zavara, sejthalál és az Alzheimer-kór

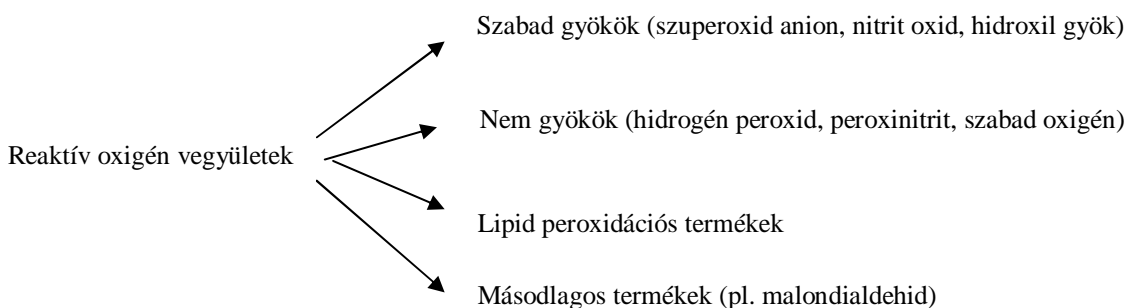
E hipotézis szerint a molekuláris-biokémiai tau és amiloid patológia a neuronok sejtosztódási ciklusának kóros aktivációjára vezethető vissza (Zhu és mtsai 2004b; Nagy 2005). Többek között magyarázatot ad arra is, hogy az AK tüneteinek fejlődése miért ismétli meg fordított sorrendben az ontogenezist és miért a filogenetikailag legújabb területek érintettek legelőször a betegség progressziója során. Elsődleges princípiuma, hogy a fejlődő agyban lezajló neuronális migráció, proliferáció és differenciálódás felnőttkori befejeződésével a normál szinaptikus működés, plaszticitás nem engedi a sejteket kilépni a differenciált állapotukból, gátolja a mitotikus reaktivációs folyamatokat. Kísérletes és neuropatológiai adatok bizonyítják, hogy a normál öregedés során és AK-ban olyan szinaptikus aktivitás zajlik, amely újra beindíthatja a kórosnak minősülő sejtosztódási ciklust (Arendt 2003). A normál, idősödő emberi agyban ez a folyamat azonban megáll a korai mitotikus fázisban (G1) és alternatív úton a normál öregedéssel járó sejthalálhoz vezethet. AK-ban a morforegulációs zavarok miatt ez a folyamat nem áll meg azonban a G1 fázisban, kóros DNS replikáció indul be, és a sejtek akár a késői G2-es fázisig eljuthatnak. Itt azonban mindenképpen elakad a folyamat, mivel a neuronok nem képesek citokinézisre. Más sejtek ilyen esetben, azaz ha sejtosztódási ciklusuk elakad, apoptózissal pusztulnak el, mivel azonban a neuronok bizonyos enzimek, fehérjék hiánya miatt relatíve védettek az apoptózistól, ezért hosszabb agóniával, aposzklézissel pusztulnak el az AK-os betegek agyában. E hosszú, évekig tartó folyamat során alakulnak ki az AK jellegzetes neuropatológiai eltérései, a SzP-ok, NFF-ok és a vaszkuláris amiloid depozitumok.

A kóros sejtosztódási ciklus beindulását számos, az AK szempontjából genetikai és epigenetikai rizikótényezőnek ismert faktor kiválthatja (Nagy 2005). Ilyen például az oxidatív stressz, hypoxia, vitamin hiány, ösztrogén hiány, homocisztein, APP, szinaptikus veszteség, pszichés stressz és depresszió. Doktori munkám során számos, a sejtosztódási ciklus zavara

hipotézis szerint kiemelkedő fontosságú epigenetikus és genetikus tényező hatását vizsgáltuk meg.

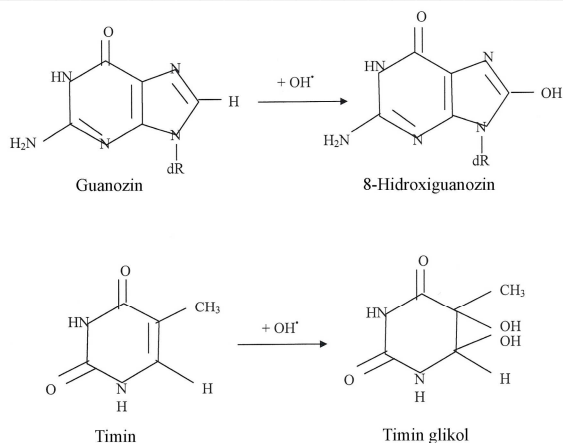
1.2.3.2. Az oxidatív stressz és az Alzheimer-kór

Akár önmagában, akár mint a kettős csapás hipotézis vagy a sejtosztódási zavar hipotézis része, az OS az AK egyik legfontosabb patoplasztikus és patogenetikus tényezője (Kálmán és mtsai 2000b; Takuma és mtsai 2005; Zana és mtsai 2006a,b). Az OS az AK már igen korai stádiumaiban (még a neuropatológiai jelek megjelenése előtt), valamint kísérletes (Pratico és mtsai 2001) és humán modelljeiben (DK, NP) is kimutatható (Perry és Smith 1998), ami arra utal, hogy a neurodegeneratív folyamat korai kontribútora, vagy éppen kiváltó tényezője (Zhu és mtsai 2004a). AK-ban és DK-ban OS indukált oxidatív károsodást mindenfajta biomolekulában kimutattak már a KIR-ben, de perifériás szövetekben is (Zana és mtsai 2006a) (2. ábra).



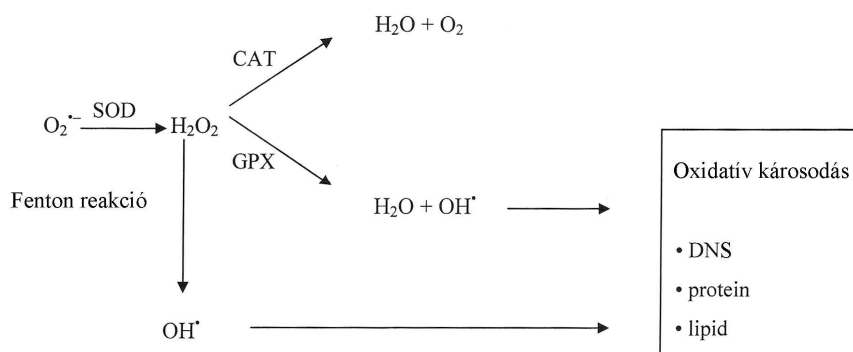
2. ábra A reaktív oxigén vegyületek sejtekben előforduló formái.

A neuronális DNS és az RNS molekulák oxidációja oxidált bázisokat, 8-OHdG és 8-OHG molekulákat hoz létre, ezen kívül nő a DNS törések száma, és a DNS repair mechanizmusok is dekompenzálódnak (3. ábra). A fehérjék oxidatív modifikációja a karbonil gyökök fokozott keletkezéséhez vezet és a tirozin aminosavak is emelkedett mértékben nitrifikálódnak. A fehérje szerkezetekből adódóan a szálak között oxidatív keresztkötések alakulhatnak ki, melyek ubikvitinizációjuk ellenére megátolják lizoszomális lebontásukat. A lipid peroxidációs termékek közül a tiobarbitursav reaktív anyagok, izoprosztánok, 4-hidroxi-2-nonenál és a foszfolipidek zsírsav összetételének változásai utalnak a peroxidatív károsodásra AK-ban. A szénhidrátok esetében fokozott glikoxidációt és glikációt figyeltek meg.



3. ábra A két legjobban tanulmányozott hidroxil szabad gyök oxidált DNS bázis termék. Guanozin: a guanin deoxiribóz származéka, dR, deoxiribóz; OH; hidroxil gyök.

A neuronokat és gliasejteket érő oxidatív stressz neuroprotektív és neurodegeneratív folyamatokat indukálhat (4. ábra). Az oxidatív mechanizmusok az antioxidáns enzimek indukciójához vezethetnek, ezért fokozott $\text{Cu}^{2+}/\text{Zn}^{2+}$ szuperoxid dizmutáz, kataláz, hemoxigenáz-1, glutation reduktáz aktivitás és emelkedett hőshock fehérje szintek mutathatók ki az AK neuropatológiai elváltozásai közelében, de azoktól függetlenül is.



4. ábra A szabad gyökök keletkezése ($\text{O}_2^{\bullet-}$, OH^\bullet) és az oxidatív stressz elleni védekező mechanizmusok.

A sejtek szignalizációs folyamatai is megváltoznak (Zhu és mtsai 2004a). Stressz aktivált protein kináz transzkripció faktor rendszerek (JNK-SAPK, p38-SAPK) aktiválódhatnak, amelyek a stresszjeleket a sejtmag felé továbbítják, befolyásolva a defenzív fehérjék génjeinek expresszióját, vagy éppen apoptotikus, vagy nekrotikus sejthalál irányába terelve a folyamatot (Kálmán és mtsai 2000b; LeBlanc 2005; Zana és mtsai 2006a). Ezek az eltérések mind kimutathatóak az AK betegek agyában és szerepük van az APP és tau proteinek kóros metabolizációjának fenntartásában (Ueberham és Arendt 2005). Fontos azonban megemlítenünk, hogy annak ellenére, hogy a JNK-SAPK szignalizációs rendszer aktivációja apoptotikus sejthalált indukál, az AK lefolyásának időkinetikája és sajátosságai inkább nekrotikus sejthalál dominanciát feltételeznek.

1.2.4. Az Alzheimer-kór koleszterin hipotézise

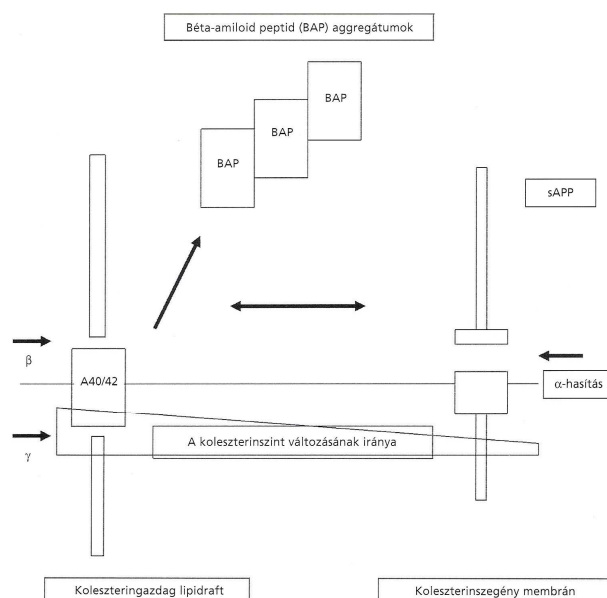
Epidemiológiai, genetikai, biokémiai és farmakológiai vizsgálatok eredményei szolgáltatnak egyre több bizonyítékot arra vonatkozóan, hogy a koleszterin és kóros anyagcseréje fontos szerepet játszik az AK kialakulásában (Hofman és mtsai 1997; McConathy és mtsai 1997; Notkola és mtsai 1998; Kálmán és Janka 2005a). A tényt, hogy az AK betegek agyában az erek ateroszklerózisa is jelen van, már Alois Alzheimer is leírta eredeti közleményében. Ezt a megfigyelését azonban sokáig elhanyagolták, mellékleletnek gondolták a klinikusok és a neuropatológusok, és csak az utóbbi években kapott újra figyelmet az agyi erek szklerózisa, mint patoplasztikus tényező az AK kialakulása szempontjából (Roher és mtsai 2003, Kalback és mtsai 2004). Ez a hatás kétféleképpen is lehetséges: egyrészt az emelkedett szérum koleszterin és triglicerid szintek az agyi erek ateroszklerózisához vezetnek, amely agyi perfúzió romlást okoz, és rizikóként szerepel az AK, a vaszkuláris demenciák, és a Magyarországon igen gyakori kevert demencia formák kialakulásában (Kálmán és mtsai 1999; Kivipelto és mtsai 2001). Másrészt longitudinális nyomonkövetéses vizsgálatok eredményei arra utalnak, hogy a középkorú életszakasz emelkedett koleszterin szintjei később közvetve kognitív károsodáshoz és az AK kialakulásához vezethetnek (Jarvik és mtsai 1995).

1.2.4.1. Az agyi koleszterin metabolizmus

Agyunk tartalmazza a legtöbb koleszterint szervezetünkben. Ha a szintézis arányait tekintjük, az összes koleszterin készlet 3%-át termeli, így csak 2%-kal marad el a máj szintetizáló kapacitásától (Dietschy és Turley 2001). A koleszterin féléletideje 170 nap agyunkban. Ez a molekula a KIR-ben szerepet játszik a sejtmembránok fluiditásának regulációjában, befolyásolva a neuron és glia specifikus szignalizációs és transzport folyamatokat (Simons és Ikonen 1997; Puri és mtsai 1999; Sing és mtsai 1999; Suzuki 2002). Ha a sejtmembrán koleszterin tartalma emelkedik, annak rigiditása fokozódik, permeabilitása pedig csökken a vízdékony molekulák számára (Kálmán és mtsai 1994). Ennek megfelelően a koleszterin részt vesz a neurotranszmitterek, receptoraik és transzportereik működésének szabályozásában. Hatását kimutatták a kolinerg, GABA-erg, szerotoninerger és excitatoros neurotranszmisszió esetében (Koudinov és Koudinova 2005).

A koleszterin részt vesz továbbá a membrán kompartmentumok kialakításában is. Vannak olyan speciális szfingolipid és koleszterin tartalmú lipid domének, raftok, melyeknek a membrán integráns fehérjék összekapcsolásában (5. ábra), vagy éppen elkülönítésében van szerepük (Brugger és mtsai 2000, Cremesti és mtsai 2002). A raftokat 50 nm nagyságú, az exoplazmatikus membrán rétegben úszó rendezett folyadékkristály állapotú, speciális összetételű membrán-fehérje szigetek alkotják (Edidin 2003). A spontán összekapcsolódott szfingolipid molekulák

szénhidrát láncai közé beékelődő koleszterin molekulák rendezett folyadék fázisokat hozva létre tömörítik a membránt, befolyásolják az idegi membránok polaritását, a szignalizációs folyamatokat, módosítják a membrán integráns fehérjék funkcionális állapotát (Sankaram és Thompson 1990; Smart és mtsai 1999; Escriba 2006). A koleszterin tehát a lipid raftok alkotórészeként mikrokörnyezetet biztosít a membrán integráns fehérjéknek (így például az APP-nek is), mivel funkcionális állapotban tartja őket a membránokban, vagy éppen módosítja azok funkciót (Simons és Toomre 2000). Ha a neuronális membránok folyékony mozaik modelljében gondolkodunk, nem csak a horizontális kompartmentalizáció, hanem a sejtmembránok kettős, cito- és exoplazmatikus rétegének koleszterintartalma is meghatározó jelentőségű a neuronális működés szempontjából, és a korral is változik. Fiatalkorban mindkét membrán oldal koleszterintartalma alacsony; később a koleszterin egyre jobban az exoplazmatikus oldalon halmozódik fel. Ha az AK amiloid hipotézisét tekintjük, beláthatjuk, hogy ez a folyamat is amiloidogén, azaz a BAP felhalmozódását segíti elő (Koudinov és Koudinova 2005). Ennek megfelelően nem meglepő tehát, hogy a poszt mortem vizsgálatok adatai szerint az AK-os betegek agya több koleszterint tartalmaz (Sparks 1997) és mennyisége pozitívan korrelál a hippocampális BAP szintekkel (Simons és Ehehalt 2002).

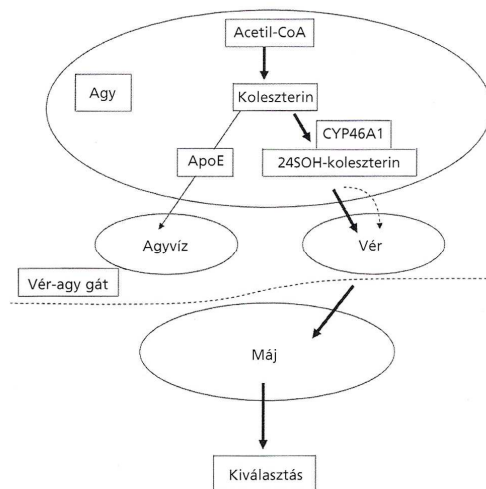


5. ábra A sejtmembrán koleszterin tartalmának változása befolyásolja az APP kompartmentalizációját és metabolikus sorsát. A két lehetséges metabolikus út vetélkedik a membrán APP készleteiért. A membrán koleszterin tartalmának növekedése a kóros béta és gamma szekretáz hasítását segíti, csökkentése pedig a normál, szolubilis, nem amiloidogén APP fragmentumok kialakulásának kedvez az alfa szekretáz hatása révén.

Arra is vannak adatok, hogy a koleszterin közvetlenül képes kötésbe lépni az APP molekulával (Koudinov és Koudinova 2005). Yao és Papadopoulos (2002) bizonyította, hogy a koleszterin az APP alfa szekretáz hasító helyéhez kötődik, gátolva annak működését. Másrészt, a koleszterin-BAP interakció fokozza az ún. amiloid mag-aggregátumok képződését, mely a SzP-ok kezdeti stádiumának felel meg (Mizuno és mtsai 1999). A koleszterin nem csak az APP

molekulával léphet kölcsönhatásba, hanem expressziójának regulációját (Kálmán és mtsai 2001; Bjelak és mtsai 2006a) és a poszt-transzlációs processzingjében részt vevő enzimek működését is képes befolyásolni (5. ábra). Magas koleszterin szint gátolja az alfa szekretáz enzim működését és ez a hatás statin kezeléssel kivédhető (Simons és mtsai 1998; Frears és mtsai 1999; Fassbender és mtsai 2001). A koleszterin szint csökkentése gátolja az APP endocitózist is és így nagyobb eséllyel bontódhat el ez a fehérje a sejtmembrán alfa szekretázai révén (Racchi és mtsai 1997).

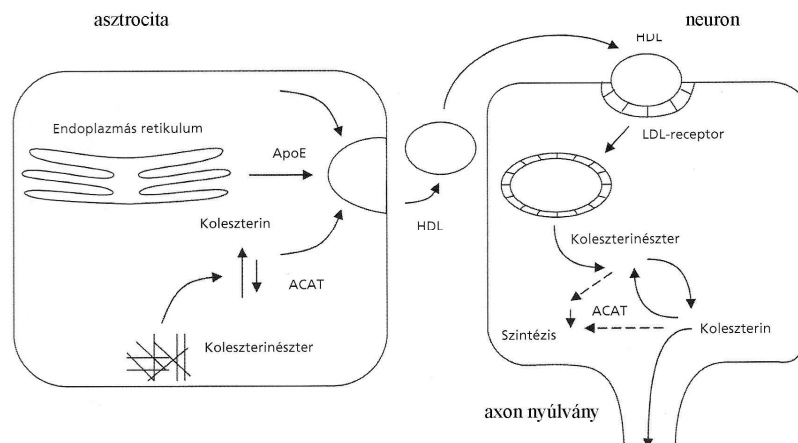
A koleszterin fontos kiinduló molekulája a neuroszteroidok szintézisének is (Kabara 1973). A gliasejtek közül pedig különösen az oligodendrocitákban található nagy mennyiségben, hiszen az általuk képzett mielin hüvely fő építőköve (Morell és Jurevics 1996).



6. ábra A koleszterin eltávolításának lehetséges útjai a központi idegrendszerben. Az agyi koleszterin helyileg, *de novo* szintetizálódik acetil-CoA-ból. A felesleges koleszterin többségét a CYP46 enzim vízoldékony 24SOH koleszterinné alakítja, amely vízoldékonyságánál fogva képes átmenni a vér-agy gáton. A véráramba kerülve a máj felveszi, és epesavakkal kiürül.

Az agyi lipid anyagcsere sajátossága, hogy ép vér-agy gát esetén nem képes az enterálisan felszívódó koleszterin és a transzportjában szerepet játszó lipoprotein partikulumok felvételére (Dietschy és Turley 2001; Roheim és mtsai 1979). Helyette acetil-koenzim A-ból kiinduló *de novo* koleszterin szintézis történik mind a neuronokban, mind a gliasejtekben, melynek kulcsenzime hasonlóan a parenchimás szervekhez, a 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzim-A reduktáz (HMG-CoA). Annak ellenére, hogy az LDL és HDL partikulumok nem jutnak át a vér-agy gáton, fő koleszterin szállító komponenseik az apolipoprotein molekulák bizonyos formái (apoAI, apoAIV, apoB100, ApoD, apoE) jelen vannak, és igen fontos szerepet játszanak a KIR-en belüli koleszterin transzportban és újrahasznosításban (6. ábra) (Pitas és mtsai 1987; Császár és mtsai 1997; Ladu és mtsai 2000; Kálmán és Janka 2005a). A likvorban az apoE és apoAI fordul elő HDL-re emlékeztető partikulumok formájában (6. ábra). Az ApoB100 csak igen kis mennyiségben mutatható ki az agyvízben (Roheim és mtsai 1979). Ennek ellenére központi idegrendszeri szintézise folyik és kóros esetekben, mint pl. AK, az apoE mellett a SzP-ok komponense.

Ma már ismert, hogy a lipoproteinek egyik legfontosabb KIR-i funkciója a koleszterin redistribúciója (7. ábra). Az apoE molekulát kötő LDL és lipoprotein receptor protein-related protein (LRP) receptorok szinte mindenütt kimutathatóak a KIR-ben, funkciójuk azonban sok esetben nem tisztázott (Mahley 1988). Az azonban bizonyított, hogy mindkettő képes az apoE és BAP felvételére is. Idegi sérülés esetén mind az apoE, mind receptorainak expressziója fokozódik a neuronokban és gliasejtekben, ezért feltételezik, hogy a lipoproteineknek szerepe lehet a neuronális regenerációs folyamatokban. Kimutatták, hogy neuronális degeneráció esetén az asztroglia sejtek fagocitálják a membrán törmelékét is, és újrahasznosítják. A membránokból származó koleszterint a gliasejtek az acetil-koenzim-A koleszterin-aciltranszferáz (ACAT) enzim segítségével koleszterin észterek formájában tárolhatják, vagy a szabad koleszterint apoE kötésben HDL partikulumok formájában rendelkezésre bocsájtják a neuronoknak, melyek LDL receptoraik segítségével képesek felvenni és újrahasznosítani a neuronális növekedés és regenerációs folyamatok során (7. ábra). Az ApoE izoformák (E2, E3, E4) koleszterin kötő kapacitása eltérő. Az E4-es izoforma a legkevésbé hatékony a koleszterin szállításában (ezt a hátrányt a 112-es és 158-as pozíciókban levő cisztein aminosavak hiányára vezetik vissza) (Zannis és Breslow 1981). A szállítási deficit a membránok koleszterin tartalmának emelkedését okozhatja, ezért nem meglepő, hogy a neuronális regeneráció szempontjából is az E4-es allélt hordozó személyek mutatják a legrosszabb teljesítményt.



7. ábra A neurogliális interakció révén a koleszterin újrahasznosul a központi idegrendszerben. A neurodegeneratív folyamat során az asztrociták fagocitálják az elpusztult sejtek törmelékét. A sejtmembránokból felszabaduló koleszterint az acetyl koenzim A aciltranszferáz (ACAT) észterifikált koleszterinné alakítja, és raktározódhat. A szabad koleszterint az apolipoprotein E (apoE) molekulák a HDL partikulumokba építik, és az asztroglia szekretálják. A felszabadult HDL-t a neuronok LDL receptoraik segítségével internalizálják és építőköveire bontják. A felvett koleszterint egyrészt újrahasznosítják az axonok és a dendritek növekedésekor, másrészt az ACAT enzim révén észterifikált formában tárolhatják intracellulárisan.

Nem csak a koleszterin szintézise, hanem lebontása és eltávolítása is eltér a többi szervtől és ennek oka a KIR esetében a vér-agy gát tulajdonságaiban keresendő (Kálmán és mtsai 1992) (6. ábra). Agyunkból a koleszterint ép vér-agy gát esetén nem képesek a lipoprotein molekulák átjuttatni, így eltávolítani. A CYP46-os enzim a koleszterint vízzoldékony 24S-OH koleszterinné

alakítja agyunkban (Bjorkhem és mtsai 1997; Lund és mtsai 1999). Ez a szterol, melyet agy specifikus volta miatt cerebroszterolnak is hívnak, már vízdékonysága miatt átjut a vér-agy gáton és bekerül a keringésbe (Bjorkhem és mtsai 1998). Az enzim szérum szintjének változásait a vérben és likvorban diagnosztikusnak tartják az AK szempontjából (Papassotiropoulos és mtsai 2000, 2002). Az AK-os betegek agyában csökkent szintek mutathatók ki immunhisztokémiával a neuronokban, az AK specifikusan érintett agyterületeken, a gliasejtekben pedig kóros mértékű indukciója jellemző (Bogdanovic és mtsai 2001). Az AK-ban kimutatható csökkent agyi CYP46A1 aktivitás a membránok koleszterin tartalmának emelkedéséhez és az APP fehérjének a koleszterin gazdag lipid raftokban történő felhalmozásához és következményes béta és gamma szekretáz aktivitásának fokozódásához, azaz BAP kialakulásához vezethet. Az AK-ban kimutatható csökkent CYP46 aktivitás tehát amiloidogén lehet. Másrészt a CYP46 2-es intronjának T/C polimorfizmusa újabban felismert rizikógén az AK kialakulása szempontjából (Desai és mtsai 2002; Kolsch és mtsai 2002; Juhász és mtsai 2005b). A TT homozigóta hordozó AK betegek agyában nagyobb az amiloid depozitumok mennyisége, csökken az enzim aktivitása, és így több koleszterin halmozódik fel a betegek agyában, elősegítve az amiloid kaszkád kóros folyamatát, a már korábban említett módon (Wolozin 2003).

A koleszterint azonban nem lehet szervezetünk és agyunk "mérge" kikiáltani. Láthatjuk, hogy alapvető építőkö és fontos metabolikus anyag, mely nélkülözhetetlen idegrendszerünk működéséhez (Koudinov és Koudinova 2005). Mind többlete, mind hiánya káros lehet, mivel metabolizmusának egyensúlya törékeny. Ha mennyisége hirtelen csökken a sejtmembránban, sejthalált okozhat. Az *in vitro* kísérletes adatok szerint, ha a membránok koleszterol tartalma 40 mol% alá esik, a sejtfunciók működéséhez elengedhetelen membrán mikrodomének összeszerelése leáll (Hailstones és mtsai 1998).

1.2.4.2. Az apoE szerepe az Alzheimer-kór kialakulásában

Az apoE az egyik legfontosabb koleszterin-szállító protein (Brown és Goldstein 1986). A KIR-ben az apoE-t elsősorban az asztrociták és makrofágok szintetizálják, melyet a neuronok LDL receptoraik segítségével felvesznek, és a szinaptikus végződéseken halmoznak fel (Boyles és mtsai 1985; Pitas és mtsai 1981, 1987b). Az apoE KIR-i funkciója rendkívül összetett: szerepe van a KIR fejlődésében, érésében, az öregedés folyamatában, a szinaptikus integritás fenntartásában, a neuronális citoskeleton stabilizálásában, az intracelluláris Ca^{2+} szintek szabályozásában, az interneuronális kapcsolatok regulációjában, az extracelluláris mátrix felépítésében, a koleszterin KIR-en belüli redistribúciójában, valamint neurotróf és szinaptotróf hatása révén a neuronális regenerációs folyamatokban (Mahley 1988; Handelsmann és mtsai 1992; Poirier és mtsai 1993, 2000; Nathan és mtsai 1994; Masliah és mtsai 1995, 1996).

Az apoE gén a 19-es kromoszóma hosszú karján helyezkedik el (Lin-Lee és mtsai 1985).

A 34 kDa súlyú proteinnek három izoformája ismert (E2, E3, E4), melyeket egyetlen lokuszon elhelyezkedő kodomináns módon öröklődő, három különböző allél határoz meg (E2, E3, E4) (Zannis és Breslow 1981). A három izoforma a 112-es és 158-as pozícióban elhelyezkedő aminosavak tekintetében tér el egymástól: E3-nál a 112-es helyen cisztein található, a 158-on pedig arginin, az E2 esetében mindkét pozícióban cisztein, az E4 molekulában pedig arginin található (Mahley 1988; Han és mtsai 2003). Ez az aminosav csere az oka, hogy az apoE4-es molekula nem képes intra- és intermolekuláris diszulfid kereszthidak kialakítására (Selkoe és Lansbury 1999). Az egyes izoformák eltérő fiziko-kémiai tulajdonságai eltérő hatásokat is okoznak. Igazolást nyert például, hogy különböző hatásfokkal képesek fokozni a neuritok növekedését a következő sorrendben: E2 > E3 > E4 (Nathan és mtsai 1994).

Polimorf génvariánsai közül az E4-es allél, 1993 óta, mint rizikótényező ismert az AK kialakulása szempontjából (Strittmatter és mtsai 1993). Az E4 allél a késői kezdetű familáris esetek 65%-ában, a sporadikus formák 50%-ában fordul elő a vizsgált populációktól függően (Saunders és mtsai 1993, 2000; Roses és mtsai 1995; Kálmán és mtsai 1996a,b, 1997, 1998, 2003; McConathy és mtsai 1997). Az E4 allélt hordozó személyeknek tehát nagyobb esélyük van arra, hogy AK alakuljon ki náluk, de a kockázat növekedése mellett korábban is beindul náluk a neurodegeneratív folyamat, mint az E3 allélt hordozóknál (Mahley és mtsai 2006a,b). Továbbá, a demencia foka is súlyosabb az E4 allélt hordozók esetében. Ezt azzal a neuropatológiai megfigyeléssel hozzák kapcsolatba, hogy az E4 allélt hordozó AK-os betegek agya több BAP-ot tartalmaz (Schmechel és mtsai 1993; Gomez-Ramos és mtsai 2001). Az E2-es allél öröklése pedig ellentétes hatású, hiszen védőtényezőnek bizonyul az AK kialakulása szempontjából. Ma már arra is vannak adatok, hogy az apoE polimorfizmus egészséges személyek esetében is befolyásolja a kognitív mnesztikus folyamatokat, mivel az E4 allél hordozók vizuokonstruktív kapacitása, tanulása gyengébb, mint a más allélt hordozó személyeké (Caselli és mtsai 2004).

Az apoE allélok megoszlása nagyon heterogén a különböző normál és AK populációk, etnikumok esetében, bizonyos kluszterek azonban egyértelműen megállapíthatóak (Hallman és mtsai 1991; Schmitt és Estus 2004). Egyes ázsiai népcsoportoknál (kínai, japán) a legalacsonyabb az E4 allél előfordulása (Hu és mtsai 2000), és ez összefüggésben lehet azzal, hogy náluk az AK ritkábban fordul elő, és az E4 allél öröklése kevésbé jelent rizikót az AK kialakulása szempontjából (Schmitt és Estus 2004). Más ázsiai országok (India, Indonézia egyes népcsoportjai) az európai, kaukázusi apoE allél gyakorisági mintázatot mutatnak (Hallman és mtsai 1991). A magyarokat összehasonlítva más európai népcsoportokkal, Hallman és mtsai (1991) munkája szerint a finnekkel közös kluszterbe kerülünk. Ezek az adatok a közös finnugor történeti, nyelvészeti és genetikai eredetet (indo-európai) támasztják alá, habár számos ellentmondás is ismert ezzel kapcsolatosan (Ruhlen 1987; Harding és Sokal 1988). Vizsgálataink

egyik fontos célkitűzése volt ezért a magyarországi AK és KT populációk genetikai rizikóinak feltérképezése.

Annak ellenére, hogy az E4 allélt már közel 10 éve ismerik az AK rizikógénjeként, még mindig nem tudjuk pontosan, hogy hogyan is fejti ki ezt a hatását a KIR-ben (Kálmán és Janka 1996a; Kálmán és Janka 2005a; Palotás és Kálmán 2006). A E4 allél hordozóknál fokozott BAP lerakódást, csökkent BAP lebontást és csökkent neuronális javító mechanizmusokat találtak (Weisgraber és Mahley 1996), de arra is vannak bizonyítékok, hogy közvetlenül a koleszterin anyagcserére kifejtett hatása révén fokozza az AK kialakulásának rizikóját. Az apoE4 allél öröklése magasabb szérumban koleszterin szintekkel jár, valamint ahogy korábban is említettük, ez az izoforma kevésbé képes a molekula eltávolítására a neuronokból (ezt a ciszteinek hiányára vezetik vissza a 112 és 158-as pozíciókban), (Sing és Davignon 1985; Michikawa és mtsai 2000). Az E4 allél hordozók fokozott AK rizikója tehát magyarázható a kombinált koleszterin-amiloid hipotézis alapján, hiszen a membránok koleszterin tartalmának elégtelen eltávolítása, az APP-t kóros helyen hasító béta és gamma szekretáz aktivitás irányába tolja el az APP metabolizmus törékeny egyensúlyát.

Másrészt arra is vannak adatok, hogy az apoE molekula BAP eltakarítóként is működik, mivel ha a toxikus peptidet megköti az extracelluláris térben, receptora, az LDL receptor segítségével képes internalizálni azt az endoszomális-lizoszomális rendszer irányába (Beyreuther és Poirier 1996; Bales és mtsai 1997). Az a tulajdonsága, hogy nem csak a fibrilláris, hanem a szolubilis BAP formákat is megköti, arra utal, hogy fiziológiai funkciói közé tartozhat a BAP szállítás a likvor irányában (Russo és mtsai 1998). Nem meglepő, hogy a molekula ezen funkciója is izoform specifikus, csak éppen a neurotróf hatással ellentétes sorrendben, azaz: E2 > E3 > E4 (Raber és mtsai 2004). Az E4-es forma gyengébb teljesítményéért szerkezeti sajátosságait, azaz a diszulfid hidak hiányát teszi felelőssé (Nathan és mtsai 1994). Feltételezhető, hogy az AK-os betegek agyában, ha túl sok BAP keletkezik, akkor már bármelyik izoformáról is van szó, nem bír megbírkózni "takarítói" feladataival, és az el nem szállított BAP-ApoE extracelluláris komplexek formájában rakódik le, amely a plakkok képződésének magja lehet (Palotás és Kálmán 2006).

Az apoE nem csak a BAP-ot, hanem az AK másik neuropatológiai sajátosságát, a tau proteint (az NFF-ok építőköve hiperfoszforilált állapotban) is képes megkötni, és ezzel megakadályozza annak hiperfoszforilációját (Mahley és mtsai 2006b). Ha ez a szerepe elégtelen, a tau fehérje kóros polimerizációjához jöhet létre (Han és mtsai 1994). Ebben az esetben is az E4-es izoforma bizonyul legkevésbé hatékony védő tényezőnek (Russo és mtsai 1998).

1.2.4.3. A szérumban a lipidek és az Alzheimer-kór

Az emelkedett szérumban koleszterin és lipoprotein szintek, mind a kardiovaszkuláris betegségek, mind az AK vonatkozásában rizikótényezőknek minősülnek a kognitív zavarok kialakulását illetően (Buxbaum és mtsai 2002). A koleszterin szint és az AK rizikóját elemző keresztmetszeti vizsgálatok eredményei ellentmondásosak. Van ahol az emelkedett (Notkola és mtsai 1998; Evans és mtsai 2000) és van, ahol a csökkent szérumban koleszterin szinteket hozták kapcsolatba az AK rizikójával (Romas és mtsai 1999). Hasonló ellentmondásosság uralkodik a lipid profil és AK rizikó összefüggéseit vizsgáló prospektív tanulmányok eredményeiben is, hiszen pozitív és negatív eredményeket, de a kapcsolati összefüggés hiányát is leírták már (Swan és mtsai 1992; Zimetbaum és mtsai 1992; Yoshitake és mtsai 1995; Moroney és mtsai 1999). A biztos konklúzió hiányát valószínűleg az esetszámok elégtelen volta és az AK diagnózisa körüli találati bizonytalanság okozza. Kiemelendő egy longitudinális finn vizsgálat, amelyben 6.5 mmol/l-nél magasabb szérumban koleszterin szintek szignifikánsan megemelték az AK rizikóját a nyomonkövetés során (Kivipelto és mtsai 2001).

Ha a terápia oldaláról vizsgáljuk a szérumban koleszterin szintek és az AK összefüggéseinek kérdését, akkor egyértelműbbek az eredmények. A retrospektív klinikai vizsgálatok szerint a magas koleszterin szint miatt statinokat szedőknél 60-73%-kal kisebb az AK prevalenciája (Hajjar és mtsai 2002; Rockwood és mtsai 2002), de ebben a témában is ismeretesebb negatív eredmények (Scott és Laake 2001; Tokuda és mtsai 2001). A koleszterin szintézis sebességét meghatározó enzimet, a HMG-CoA-t gátló statinok közül több (lovastatin, simvastatin, pravastatin), lipid oldékonyságánál fogva átjut a vér-agy gáton, és gátolja az agyi HMG-CoA reduktázt is (Tsuji és mtsai 1993; Saheki és mtsai 1994). A hatás specifikusságát mutatja, hogy más statinok és lipid metabolizmust gátló anyagok (fibrátok, nikotinsav, kolesztiramin) nem mutatnak preventív hatást az AK kialakulása szempontjából (Jick és mtsai 2000).

Az epidemiológiai adatok, és az AK koleszterin és amiloid hipotézisét alátámasztó direkt és indirekt bizonyítékok ellenére a statinok AK-ban történő alkalmazásával kapcsolatos klinikai vizsgálatok eredményei nem hoztak átfogó sikereket hatékonyságukat illetően (Scott és Laake 2001; Tokuda és mtsai 2001). A rendelkezésre álló eredmények szerint, annak ellenére, hogy a 24S koleszterol és a likvor BAP/tau protein hányadost kedvező irányba módosítja a statin kezelés, az AK klinikai tüneteiben nem figyeltek meg érdemi változást.

Arra, hogy a statin kezelés AK szempontjából fontos mechanizmusában más, nem csak a HMG-CoA-t gátló hatásuk szerepelhet Darvesh és mtsai (2004) mutattak rá. Kimutatták, hogy a simvastatin és lovastatin olyan mértékben képes gátolni az acetilkolin lebontásáért is felelős BChE enzimet, amely nagyságrendben megfelelt az AK kezelésében sikeresen használt ChE gátló molekulák, pl. a galantamin terápiás hatásának. Saját vizsgálataink pedig arra mutattak rá,

hogy a szérum triglicerid szintek és a szérum BChE aktivitása között is van összefüggés (Kálmán és mtsai 2004a,b).

1.2.5. A genomikai vizsgálatok jelentősége az Alzheimer-kór kutatásában

A genomika a genomot alkotó gének egymással és a környezettel való kölcsönhatásait vizsgáló tudomány. A genomikai szemlélet és a genomikai korszak születését 2003. április 14-től számítja a tudománytörténet, mivel ezen a napon jelentették be a Humán Genom Projekt sikerét, azaz a teljes emberi genom szekvenálását. A humán genom több mint 10 millió SNP-t tartalmaz. Már több mint harminc éve ismert, hogy az SNP-k a teljes humán genomban szétszórva helyezkednek el, és ezzel a genom hozzájuk közel eső részét jelölik is. Ezt a kvázi-jelölő tulajdonságukat használják a különböző betegségekkel kapcsolatos gének felismerésében, feltérképezésében úgy, hogy ha egy SNP és egy betegség között kapcsolat mutatható ki, akkor feltételezik, hogy az SNP közeli gének, vagy közvetlenül az SNP maga szerepet játszhat a zavar kialakításában (Bunney és mtsai 2003; Mirnics és mtsai 2006). Ezért a neurodegeneratív betegségekkel kapcsolatos kutatások egyik igen fontos célja az SNP-t hordozó, vagy a közeli rizikógén megkeresése, feltérképezése (Wilson és mtsai 2004; Palotás és Kálmán 2006). Ma már tudjuk, hogy az SNP-k csoportokat, haplotípusokat alkotnak, és az egyes csoportokat szerencsés esetben akár egyetlen SNP felismerésével is azonosítani lehet.

A genetikai jellegű ikerkutatások adatai szerint az agyi betegségek okozta társadalmi tehertétel 40%-a valószínűleg genetikai háttérre vezethető vissza és a költségek többsége az összetett, többgénés betegségek és hatások miatt van (Uhl és Grow 2004).

Az egyes betegség-specifikus SNP-k felismerése nagy jelentőségű lehet az AK patomechanizmusának megismerése szempontjából (Palotás és Kálmán 2006). Az AK genetikájának megismerésére irányuló kezdeti kutatások révén a klasszikus mendeli öröklésmentet mutató AK-t okozó gének ismertük meg. Mivel a monogén AK formák csak az esetek 2%-áért felelősek, később a jóval gyakoribb, komplex genetikai hatások és rizikógének feltérképezésére terelődött a figyelem. Saját vizsgálataink egyik célkitűzése is ezzel kapcsolatos lett: az AK szempontjából rizikó SNP-nek ismert apoE polimorfizmus jellemzése különböző demenciákban és társuló kórformákban, magyar populációban.

Genetikai vizsgálataink megkezdése óta, a genomika technikai és ismereti fejlődésével az új cél, a humán genom haplotípus térképének, „HapMap”-nek és a betegség-specifikus haplotípus térképeknek elkészítése lett a neurodegeneratív betegségek, így az AK esetében is (The International HapMap Consortium 2005). Ezekkel az új módszerekkel, az izolált SNP-k keresése helyett, gyorsabban és egyszerűbben lehet a betegségekkel kapcsolatos géneket azonosítani. Az ilyen irányú kutatások azért is fontosak, mert lehetőséget adhatnak a betegségcsoport tagjainak

genotípus alapján történő csoportosítására, molekuláris szintű jellemzésére. Továbbá az AK háttérében álló genetikai sérülékenység jobb megismerése révén tisztázódhatnak a genetikai és epigenetikai kölcsönhatások is. Az etiológiai és nozológiai kérdések eldöntése mellett az AK új, komplex genetikájú betegségként való értelmezése és kutatása segíthet a demencia spektrumába tartozó betegségek új, genotípus szerint „testre szabott” terápiáinak kidolgozásában is (Palotás és Kálmán 2006). Többek között ezért tarthatjuk fontosnak az AK determinisztikus és rizikógénjeivel kapcsolatos kutatásokat.

1.2.6. A pszichofarmakonok hatása az APP anyagcseréjére

A klórpromazint több mint ötven éve kezdték alkalmazni pszichiátriai indikációval, és bevezetése forradalmasította a pszichofarmakológia tudományát. Azóta antipszichotikumokat, antidepresszívumokat, anxiolitikumokat, hipnotikumokat és anesztetikumokat folyamatosan használnak a különböző eredetű demencia szindrómák, így az AK-ban előforduló viselkedési és affektív tünetek kezelésére, bár a bizonyítékokon alapuló alkalmazás kritériumai nem teljesülnek a legtöbb említett időskori indikációban (Rajna és Tariska 2000; Tariska 2000a,b; Kovács 2003).

A viselkedési és pszichés tünetek igen gyakoriak a demencia szindrómákban, pl. az AK betegek 60-90%-ánál fordulnak elő. A klinikai gyakorlatban, a demenciához kapcsolódó pszichiátriai szindrómákat tekintve, antipszichotikumokat alkalmaznak a delírium, pszichózis, agitáció, agresszív viselkedés, és bizonyos esetekben az affektív betegségek esetében is, annak ellenére, hogy ezek az indikációk nem szerepelnek a típusos és a legújabb atípusos szerek indikációs javaslataiban sem (Moretti és mtsai 2006). Ennek ellenére az idősek otthonaiban elhelyezett személyek 25-30%-a szed antipszichotikumokat.

A helyzetet tovább bonyolítják az utóbbi 4-5 év klinikai vizsgálatainak megfigyelései arra vonatkozóan, hogy mind az atípusos, mind a típusos antipszichotikumok növelik a mortalitást és a cerebrovaszkuláris betegségek rizikóját AK, és kevert AK-VD betegek esetében (Schneider és mtsai 2005). További probléma, hogy ezeket a pszichofarmakonokat a különböző neuropszichiátriai zavarokkal gondozott (nem demens) betegek világszerte szedik évekig-évtizedekig, annak ellenére, hogy nem, vagy alig tudjuk, hogy ezek a vegyületek milyen hatással vannak az AK-ban lezajló neurodegeneratív folyamatra, azaz szedésük protektív hatású, vagy éppen rizikótényezőt jelent az AK kialakulása, vagy éppen progressziója szempontjából.

Ha az AK amiloid hipotézisében gondolkodunk, akkor azt is el kell ismernünk, hogy nem tudjuk, hogy ezek a vegyületek hogyan befolyásolják az APP anyagcseréjét. Az utóbbi években néhány adat jelent meg arra vonatkozóan, hogy a butirofenon és fenotiazin csoportba tartozó antipszichotikumok proteáz aktivitás-moduláló hatással is rendelkeznek, és így szedésük akár az APP patogén poszt-transzlációs processzingjét is módosíthatja (Jarskog és mtsai 2006).

Depressziós tünetek is gyakran előfordulhatnak az AK prodromális időszakában, a kognitív deficit fokozott szubjektív megélése során, és a későbbiekben a betegség enyhé-középsúlyos szakaszaiban (Rajna és Tariska 2000; Tariska 2000a,b; Kovács 2003). Az affektív tünetek gyakorisága AK-ban akár 40-70%-os lehet, melyhez szorongásos tünetek is társulhatnak 30-50%-os gyakorisággal (Burgut és mtsai 2006). Ezeket a szindrómákat antidepresszívumok és anxiolitikumok adagolásával próbálják enyhíteni az AK-os betegek esetében. Hasonlóan az antipszichotikumokhoz, az antidepresszívumok és anxiolitikumok hatását sem ismerjük az AK patomechanizmusát illetően. A szerotoninerg és noradrenerg neurotranszmisszióra kifejtett stimuláló hatásuk javíthatja az AK kognitív mnesztikus tüneteit (Ownby és mtsai 2006). Továbbá, az antidepresszív szerek bizonyított neurotrofikus hatása kedvező lehet az AK-ban zajló neurodegeneratív folyamat lassítása, kezelése vonatkozásában is, de a doktori értekezésemben bemutatott vizsgálatokig nem rendelkezünk adatokkal az APP metabolizmusára kifejtett hatásokról sem.

A legújabb genomikai módszerek, pl. a DNS lapka technológia, EMSA, QRT-PCR elterjedése lehetőségeket adott számunkra a pszichofarmakonok hatásainak komplex vizsgálatához a génkifejeződés szabályozásának vizsgálatában. Ezeket a módszereket alkalmazva próbáltuk megválaszolni az értekezés irodalmi áttekintés részében felvázolt problémákat.

*Nem érdemelsz bizalmat,
ha túl sokat ígérsz.
Ahol sok a könnyű, ott sok a nehéz.
Ezért a bölcs
nem kerüli a dolgok nehezét,
az erőlködés mégse veti szét.
Lao-ce*

2. Kutatási célkitűzések

1. Az n-3 zsírsavakban gazdag halolaj diéta hogyan befolyásolja patkány agyi mikroerek membránjainak zsírsav összetételét és arachidonsav metabolizmusát?
2. Hogyan változtatja meg a magas koleszterin tartalmú diéta az AP-1 és NFκB transzkripció faktorok működését nyulak agyában?
3. Hogyan hat a magas koleszterin tartalmú diéta az APP metabolizmusára apoB transzgenikus egerek agyában?
4. Hogyan hat a biglikán és az apoB izolált és közös expressziója transzgenikus egerekben az APP agyi transzkripciójára?
5. Milyen az AK-os betegek trombocitáinak membrán fluiditása és plazma MDA szintje?
6. Kimutatható-e az apoD az AK-os betegek agyában, és ha igen, jelenléte kapcsolatba hozható-e a neurodegeneráció vagy az öregedés folyamatával?
7. Milyen mértékű rizikótényező az apoE génjének polimorfizmusa a magyar AK-os betegek esetében? E4-es alléljának öröklése rizikónak minősül-e más neuropszichiátriai betegségekben (VD, expresszív beszédfejlődési zavar)?
8. Az apoE gén E4-es alléljának öröklése befolyásolja-e AK-os betegek szelegilin kezelésének kognitív változóit?
9. Befolyásolja-e az apoE gén E4-es alléljának öröklése AK-os betegek kinurenin metabolizmusát a vérben?
10. Hogyan befolyásolja az apoE gén promoter régiójának -491A/T polimorfizmusa az AK rizikóját? Kimutatható-e interakció az apoE gén E4-es alléljának öröklése és a gén promoter régiójának polimorfizmusa között?
11. Rizikónak minősül-e a CYP46A1 enzim génjének T/C polimorfizmusa a magyarországi AK-os betegek esetében? Kimutatható-e interakció az apoE gén E4-es allélja és a 24(S)hidroxiláz gén C-allélja között?
12. Hogyan változik az AChE enzim aktivitása AK-os betegek vérésejtjeiben? Az AChE milyen molekuláris formái fordulnak elő a vérésejtekben? Vannak-e AK specifikus eltérések arányaikban? A BChE génjének K-allélja milyen gyakori a magyar AK-os betegek esetében? A BChE-K variáns génjének hordozása milyen kapcsolatban van az apoE gén E4-es alléljának öröklésével?

13. Hogyan változik a szérumban AChE és BChE enzimek aktivitása IIb típusú hiperlipidémiában?
Van-e kapcsolat az apoE gén E4 alléljának öröklése és a ChE enzimek aktivitása között?
14. Az oxidatív stressz milyen mértékű és jellegű DNS károsodást okoz különböző korú Down-kóros személyek limfocitáiban?
15. Milyen mértékben fogékonyak az AK-os betegek limfocitái az UVB fény kiváltott apoptotikus sejthalálra?
16. Milyen génexpressziós eltérések mutathatók ki az AK-os betegek limfocitáiban?
17. Hogyan befolyásolják az antidepresszív szerek a központi idegrendszeri génexpressziót patkányban?
18. Hogyan befolyásolják az antidepresszív szerek az APP metabolizmusát patkány agyban?
19. Hogyan hat a szelektív szerotonin újrafelvétel gátló citalopram és a kombinált noradrenerg és szerotoninerget hatású mirtazapin AK betegek limfocitáinak génexpressziójára?
20. Hogyan befolyásolja a kevert noradrenerg és szerotoninerget hatású venlafaxin antidepresszívum kezelés az idős, pseudodemens személyek limfocitáinak génexpressziós mintázatát?
21. Hogyan befolyásolják az antipszichotikumok a génexpressziót patkányok agyában?
22. Hogyan befolyásolják az antipszichotikumok az APP agyi metabolizmusát patkányokban?
23. Hogyan befolyásolja az addiktív szerek közül a 3,4-metiléndioximetamfetamin (MDMA) és a morfin krónikus adagolása az APP agyi anyagcseréjét?
24. Hogyan hatnak a benzodiazepinek az APP szintekre patkány agyban?

Módszertani összefoglaló

A kutatási módszerek összefoglaló bemutatása a Függelékben található.

*Nem azért figyelj – mondta a Mester -, hogy felfedezz valamit, hanem azért hogy találj valamit, ami igazolja az elképzeléseidet.
Nem azért érvelsz, hogy rálelj az igazságra, hanem hogy megvédj a saját gondolataidat.*
Anthony De Mello

3. A kutatási eredmények értékelő ismertetése

Az eredmények ismertetése során a doktori értekezés anyagát képező saját közleményeket a többi irodalmi hivatkozástól való könnyebb megkülönböztetés céljából (*dőlt*) betűkkel emeltem ki. A hivatkozott saját közlemények listája külön fejezetben található meg a doktori értekezésben.

3.1. Az n-3 zsírsavakban gazdag halolaj diéta hogyan befolyásolja patkány agyi mikroerek membránjainak zsírsav összetételét és arachidonsav metabolizmusát?

A szenilis demenciát történetileg az erek „keményedésére” vezették vissza (Hachinski 1990) és a VD-hoz hasonlóan az AK etiopatogenezisében is kiemelkedően fontos szerepet tulajdonítanak a vaszkuláris rizikótényezőknek (Kalaria 2000, Atkinson 2001). Az AK vaszkuláris hipotézise szerint az agyi erek funkciózavara és strukturális eltérései (vaszkuláris amiloid depozitumok) következtében kialakult mikro- és makro-ér eltérések agyi vérátáramlási zavarokhoz, és az agyszövet metabolikus kríziséhez vezethetnek következményes neuron pusztulással és glia sejt aktivációval (Nagy 2003). A cerebrovaszkuláris tényezők és az AK és VD közötti kapcsolatokat igazolják az „Apáca” vizsgálat eredményei is (Snowdon és mtsai 1997) és saját SNP vizsgálataink is (Janka és mtsai 2002). Kalaria (2003) ezért az AK és VD közötti kontinuum lehetőségét veti fel, azaz olyan klinikai és neuropatológiai szindrómák láncolatát, amelyekben a két betegség együtt, de különböző arányokban fordul elő.

Az agyi mikroerek endotel sejtei és az ezeket körülölelő gliasejtek alkotják az agyba és az agyból kijutó anyagok szállítása és immunfunkciók miatt különlegesnek tekintett funkcionális egységet, a VAG-at (Joó 1986). Normál és kóros körülmények között az agyi mikrocirkuláció szabályozásában a NO és a vazoaktív neurotranszmitterek mellett az endoteliális sejtek COX és LOX enzimek által termelt vazoaktív prosztanoid származékok is fontos szerepet játszanak (Gecse és mtsai 1982; Phillis és mtsai 2006). Mind AK-ban, mind VD-ban kimutatható a VAG működészavara is (Zlokovic 2005), ezért minden olyan beavatkozás (diéta, gyógyszerek), amely a VAG működését, például a COX és LOX enzimeket befolyásolja, hatással lehet az AK és VD patomechanizmusára is.

A tengeri halak olajának fő zsírsav komponensei az n-3 zsírsavak, azaz az EPA és a DHA. A n-3 zsírsavak jótékony hatását az AK-val kapcsolatosan is felvetették (Morris és mtsai 2003; Cao és mtsai 2005; Hashimoto és mtsai 2005; Florent és mtsai 2006). Pozitív hatásukat igazolták a tanulási és memória folyamatokra patkányokban (Hashimoto és mtsai 2002), bár a

humán prospektív vizsgálatok eredményei nem erősítették meg ezeket a megfigyeléseket (Laurin és mtsai 2003) és rövidtávú kísérletes alkalmazásuk sem bizonyult hatékonynak AK-os betegek esetében (Boston és mtsai 2004). Az újabb prospektív epidemiológiai vizsgálatok eredményei azonban igazolják a korábbi pozitív véleményeket arra vonatkozóan, hogy az n-3 zsírsavak diétás használata kedvező hatású az AK és VD populációkban, de csak a nem apoE E4 allélt hordozók esetében (Huang és mtsai 2005).

A halolaj diéta fő komponensének a DHA-nak neuroprotektív hatására Calon és mtsai (2004) hívták fel a figyelmet az AK egér modelljében és azóta ezt az eredményt mások is megerősítették, mivel amiloid lerakódást csökkentő hatását mutatták ki egy másik AK modellben (Lim és mtsai 2005).

Az EPA-ról bizonyították, hogy a COX hatékony gátlója a trombocitákban és a perifériás endotel sejtekben. Az azonban nem volt ismert, hogy halolaj diétás adagolása kísérletes körülmények között hogyan befolyásolja az agyi endotel sejtek zsírsav összetételét és arachidonsav metabolizmusát. Ezért kísérleteink első szakaszában erre a kérdésre szerettünk volna választ kapni.

1. táblázat A különböző diétákon tartott patkányok agyi mikroereinek zsírsav összetétele.

Zsírsav	Kontrol	Halolaj	Napraforgó olaj
14:0	6.85 ± 0.28	6.14 ± 0.35	6.52 ± 0.23
14:1	0.83 ± 0.15	0.74 ± 0.09	0.70 ± 0.09
16:0	23.16 ± 1.13	22.16 ± 1.48	22.96 ± 1.79
16:1 n-9	0.83 ± 0.09	0.95 ± 0.07	0.85 ± 0.09
16:1 n-7	1.33 ± 0.12	1.22 ± 0.10	1.39 ± 0.14
18:0	13.31 ± 0.72	13.87 ± 0.83	12.73 ± 0.79
18:1 n-9	17.85 ± 1.39	16.34 ± 1.12	18.11 ± 0.81
18:2 n-6	3.46 ± 0.23	3.25 ± 0.27	3.93 ± 0.22
20:0	1.26 ± 0.28	1.01 ± 0.27	1.35 ± 0.12
20:1 n-9	1.05 ± 0.07	0.93 ± 0.12	1.12 ± 0.08
20:4n-6	14.79 ± 2.10	13.65 ± 1.72	15.17 ± 1.90
20:5 n-3	n.d.	0.80±0.07*	n.d.
22:4 n-6	1.50 ± 0.11	1.01 ± 0.13*	1.59 ± 0.08
22:5 n-6	0.76 ± 0.08	0.46 ± 0.05*	1.13 ± 0.14
22:5 n-3	0.51 ± 0.11	0.89 ± 0.07*	0.44 ± 0.09
22:6 n-3	6.87 ± 0.52	9.28 ± 0.65*	5.73 ± 0.91
n-3 (összes)	7.19 ± 0.80	10.97 ± 1.26	7.31 ± 0.98
n-6 (összes)	20.31 ± 2.31	18.37 ± 2.15	21.72 ± 2.59
n-3/n-6	0.34 ± 0.02	0.52 ± 0.04**	0.32 ± 0.07
n-3 + n-6	27.05 ± 3.07	29.13 ± 3.25	28.89 ± 1.61

A táblázatban a zsírsavak százalékos arányát tüntettük fel. Az adatok átlag ± SEM-ben vannak kifejezve. Minden mérési érték 7 állat összevont mintáiból lett kiszámítva. * $p < 0.05$; ** $p < 0.02$

Ahogy az 1. táblázat szemlélteti, már rövid, 4 hetes halolaj diéta is szignifikánsan megemelte az n-3 zsírsavak mennyiségét (20:5; 22:5; 22:6) a KT és napraforgó olaj

kezelésekhez viszonyítva a patkány agyi mikroerekben. Figyelemre méltó, hogy annak ellenére, hogy az n-3/n-6 arány szignifikánsan megnőtt a halolaj kezelt állatok mikroereiben, a többszörösen telítetlen zsírsavak összes mennyisége nem változott. Ez a megfigyelés arra utal, hogy az agyi mikroerek membránjainak zsírsav összetétele rendkívül szoros metabolikus kontroll alatt állhat, az n-3 és n-6 csoport mennyisége csak egymás rovására változhat, és összmennyiségük a diétás kezelés általunk alkalmazott formájával nem befolyásolható. Ebben a tekintetben az agyi mikroerek más sejtekhez hasonlóan viselkednek (Gibson és mtsai 1984).

Eredményeink szerint az n-3 zsírsavak közül a DHA található meg legnagyobb mennyiségben az agyi endotel sejtek membránjaiban (Kálmán és mtsai 1992). Erről a zsírsavról tudjuk, hogy fontos szerepe van a sejtmembránok fluiditásának és permeabilitásának fenntartásában, mivel a membrán integráns fehérjék mikrokörnyezetét alkotja (Glomset 2006). Feltételezhető tehát, hogy a halolaj kezelés hatására megemelkedett n-3/n-6 arány is szerepet játszhat a kísérleteinkben megfigyelt arachidonsav metabolit szint változásaiban (2. táblázat).

2. táblázat A különböző diéták hatása a patkány agyi mikroerek arachidonsav metabolit összetételére.

	Kontrol	%	Halolaj	%	Napraforgó olaj	%
Összes termék	22907 ± 3873	(100)	11021 ± 1747*	(100)	20104 ± 2448	(100)
6-keto PGF-1	803 ± 56	3.5	566 ± 92*	5.1	909 ± 84	4.5
PGF-2,	839 ± 80	3.6	583 ± 70*	5.3	770 ± 55	3.8
TXB-2	1011 ± 129	4.4	921 ± 68	8.3	1176 ± 147	5.8
PGD-2	966 ± 152	4.2	939 ± 101	8.5	1271 ± 54	6.3
PGE-2	703 ± 84	3.0	542 ± 83	5.0	858 ± 91	4.2
HHT	1846 ± 410	8.0	1072 ± 247*	9.7	1554 ± 334	7.7
HPETE; HETE	16573 ± 3131	72.2	6399 ± 1358**	58.0	3526 ± 2280	67.2
COX.	6334 ± 689	27.6	4622 ± 407*	41.9	6578 ± 351	32.7
LOX./COX.	2.50 ± 0.30		1.33 ± 0.16**		2.03 ± 0.30	
vazokonstriktor/ vazodilatátor arány	0.76 ± 0.04		0.78 ± 0.10		0.64 ± 0.05	

Minden érték 8 mérés átlagát ± SEM jelenti. Az adatokat dpm/10 perc/300mg nedves agyi tömegben fejeztük ki és százalékos arányukat is bemutatja a táblázat. *p<0.05; **p<0.02

Figyelemre méltó, hogy a halolaj kezelt patkányok mikroereiben közel 50%-kal csökkent az arachidonsav metabolitok mennyisége. Ez a csökkenés mind a COX, mind a LOX termékek mennyiségére vonatkozott. A COX termékek közül különösen a 6-keto PGF-1α, PGF-2α és a 12-OH heptadekatetraénsav mennyisége csökkent jelentős mértékben, a PGD-2, PGE-2 és a HHT mennyisége pedig nem változott. A halolaj diéta által okozott eltérésekkel összevetve, a napraforgó olaj kezelés nem változtatta meg sem a COX, sem a LOX termékek arányát (2. táblázat).

Az AK vonatkozásában fontos megemlítenünk hogy az általunk vizsgált COX és LOX

metabolitoknak, prosztanoidoknak és oxidált származékaiknak az izoprosztánoknak vazoaktív hatásuk mellett (Bogatcheva és mtsai 2005), egyre fontosabb szerepet tulajdonítanak a neurodegeneratív folyamatok kialakításában, diagnosztikájában (Kriem és mtsai 2005) és terápiájában (Patrignani és mtsai 2005, Firuzi és Pratico 2006).

Kísérletes adataink szerint a HHT mennyisége 42%-kal csökkent a halolaj diéta hatására. A HHT-ről tudjuk, hogy gátolja a PGI-2 szintézist (Sadowitz és mtsai 1987) és erős vazoaktív hatású prosztanoid származék. A LOX termékek pedig ismert, hogy fokozhatják a vaszkuláris permeabilitást (Mayhan 2002). Adataink szerint ezek mennyisége 60%-kal csökkent a halolaj diéta hatására kísérleti állatainkban.

Az is fontos megfigyelésünk, hogy egyik fajta diétás kezelés sem változtatta meg sem a vazokonstriktor, sem a vazodilatátor hatású arachidonsav metabolitok arányát. Eredményeink megerősítik Moore és mtsai (1989), valamint Yerram és mtsai (1989) megfigyelését arra vonatkozóan, hogy az agyi mikroerek arányaikat tekintve több LOX, mint COX terméket szintetizálnak.

Az irodalomban elsőként igazoltuk, hogy rövid, 4 hetes n-3 zsírsav gazdag halolaj diétás etetés megváltoztatja felnőtt patkányok agyi mikroereinek n-3/n-6 zsírsavainak arányát, és ez a hatás befolyásolja az agyi endotel sejtek ciklooxygenáz és lipoxigenáz termékeinek mennyiségét és arányait (Kálmán és mtsai 1992). A halolaj diéta általunk megfigyelt vazoaktív hatásai kapcsolatban lehetnek az n-3 zsírsavak kedvező hatásaival az AK patomechanizmusában szerepet játszó folyamatokban és felhívják a figyelmet terápiás alkalmazásuk előnyeire, de egyben veszélyeire is.

3.2. Hogyan változtatja meg a magas koleszterin tartalmú diéta az AP-1 és NFκB transzkripció faktorok működését nyulak agyában?

Az AK betegek vizsgálatából és az AK állatmodelljeinek vizsgálatából származó eredmények egyre több bizonyítékot szolgáltatnak arra vonatkozóan, hogy a koleszterin anyagcsere zavarai központi jelentőségűek az AK-ban zajló neurodegeneratív folyamat kialakulásának rizikója és patomechanizmusa szempontjából. Ezért állatetetéses kísérleteinket folytatva, a koleszterin diétás hatását kezdtük el vizsgálni a továbbiakban olyan KIR-i folyamatok esetében, amelyeket kiemelkedően fontosnak ítéltünk meg az AK szempontjából. Ide tartoztak a transzkripció regulátorok KIR-i működésére vonatkozó kísérleteink (Kálmán és mtsai 2001).

Az ateroszklerózis nyúl modelljét azért választottuk kísérleteinkhez, mert több adat bizonyította, hogy a koleszterin diétán tartott nyulak agyában az AK-os beteghez hasonlóan extracelluláris amiloid depozitumok képződnek és rakódnak le (Sparks és mtsai 1995) és a

mikroglia sejtek aktiválódnak (Streit és Kreutzberg 1987). Azt is igazolták, hogy a koleszterin diéta hatására a neuronok fokozott apoE immunreaktivitást mutatnak (Sparks és mtsai 1995), összefüggésben az amiloid depozitumok megjelenésével, a mikroglia aktivációjával.

Összefoglalva, mivel a kardiovaszkuláris rizikófaktorok, mint például a magas vérnyomás, koronária betegség és az emelkedett vér koleszterin szintek az AK rizikótényezők között is szerepelnek (McConathy és mtsai 1997), továbbá a koleszterin diétával kísérletes ateroszklerózist lehet kiváltani nyulakban a humán eltérésekhez hasonló elváltozásokkal, az ateroszklerózis rizikótényezők és az AK kapcsolata szempontjából is ígéretes vizsgálati lehetőséget nyújtott ez az állatmodell.

Vizsgálatainkat megelőzően nem voltak adatok arra vonatkozóan, hogy a magas koleszterin tartalmú diéta hogyan befolyásolja az AP-1 és az NFκB transzkripciós faktorok *in vitro* aktivitását a KIR-ben. Mindkét általunk vizsgált transzkripciós faktorról ismert, hogy immunológiai, gyulladásos és apoptotikus sejthalál folyamatok mediátorai (Schreck és mtsai 1992; Thanos és Maniatis 1995; Baldwin 1996; Kálmán és mtsai 2000b). Továbbá, olyan, az AK szempontjából fontos fehérjék génjeinek transzkripciós regulátorai, mint az APP, apoE (Lahiri és mtsai 2004) és a COX-2 (Coyle és Puttfarcken 1993, Yan és mtsai 1995). Működésük befolyásolása ezért fontos terápiás célpont is lehet. Például az AK koleszterin terápiája szempontjából kipróbált HMG-CoA reduktáz gátló statinok aktiválják működésüket és expressziójukat (Dichtl és mtsai 2003).

3. táblázat A koleszterin diétán tartott nyulak vérplazma, máj és kortikális koleszterin tartalma.

	Kontroll (n=5)	Koleszterin kezelt (n=6)
Máj súly (g)	67 ± 11	94 ± 8 ^a
Plazma koleszterin mg/dl	51 ± 17	2342 ± 723 ^b
Máj koleszterin mg/g szövet	2.9 ± 0.2	29.1 ± 3.8 ^c
Temporális kortex koleszterin µg/mg protein	13.9 ± 1.00	15.5 ± 1.85

Átlag ± SD. ^a $p < 0.03$; ^b $p < 0.0001$; ^c $p < 0.0003$

Eredményeink szerint a 10 hétig 1% koleszterin és 10% kókuszolaj tartalmú diétán tartott nyulak plazma és máj koleszterin szintjeit a diéta igen nagymértékben megemelte, az agykéregben azonban csak kismértékben, nem szignifikáns módon emelkedett mennyiségük (3. táblázat). Ez a megfigyelésünk megerősíti a már ismert adatokat és saját korábbi megfigyeléseinket patkányokon (Kálmán és mtsai 1992) az agy metabolikus ellenállóképességéről, lipidtartalmának diétás módosítása vonatkozásában.

Adataink szerint az oxidált lipidek mennyisége szignifikáns mértékben megnőtt a koleszterin kezelt állatok vérében (4. táblázat). A diének esetében kétszeres, a triének esetében háromszoros növekedést tapasztaltuk, a TBAR mennyisége pedig ötszörösére nőtt.

4. táblázat Az oxidált lipid származékok mennyisége a koleszterin kezelt és kontroll nyulak vérplazmájában.

	Kontroll (n=5)	Koleszterin kezelt (n=6)
Diének (nM/mL)	94 ± 27	232 ± 135 ^a
Triének (nM/mL)	35 ± 14	103 ± 55 ^b
TBAR (nM/mL)	1.5 ± 0.6	8.6 ± 3.9 ^c

Átlag ± SD. ^a < 0.02; ^b < 0.07; ^c < 0.002

5. táblázat Az oxidált lipid származékok mennyisége a koleszterin kezelt és kontroll nyulak temporális agykéreg mintáiban.

	Kontroll (n=5)	Koleszterin kezelt (n=6)
Diének (nM/mg protein)	10.1 ± 2.2	9.8 ± 2.8
Triének (nM/mg protein)	8.5 ± 2.2	8.2 ± 3.0
TBAR(pM/mg protein)	807 ± 67	825 ± 285

Átlag ± SD.

A vérplazmában található lipid oxidációs termékek szintjeinek emelkedésével szemben ugyanezek a változók nem mutattak eltérést az agykéreg mintákban (5. táblázat). A koleszterin kezelt állatok agya tehát nem csak a lipid anyagcsere kísérletes módosítása, hanem a lipid oxidációs termékek tekintetében erősen ellenállónak, stabilnak bizonyult. Ez a megfigyelésünk megerősíti Mooradian és mtsai (1995) adatait ugyanezen a kísérletes állatmodellen. Eredményeink arra utalnak, hogy a KIR koleszterin és lipid anyagcseréje diétás hatásokkal nem, vagy csak nagyon kis mértékben módosítható, azaz rendkívül szoros metabolikus kontroll alatt áll.

Ahogy a 6. táblázat bemutatja, az AP-1 nukleális transzkripció faktor közel 60%-kal kisebb kötődési aktivitást mutatott az agykéreg nukleális fehérje kivonataiban a koleszterin diétán tartott nyulak agymintáiban a KT csoport értékeivel összehasonlítva. Ezzel szemben, a másik általunk vizsgált nukleális transzkripció faktor, az NFκB kötődési kapacitása nem változott a koleszterin diétát követően.

6. táblázat Az AP-1 és az NFκB transzkripció faktorok kötődési aktivitása koleszterin kezelt és kontroll nyulak temporális agykéreg nukleális fehérje kivonat mintáiban.

	Kontroll (n=5)	Koleszterin kezelt (n=6)
Nukleális AP-1 (önkényes egységekben)	39.5 ± 20.96	16.3 ± 7.18*
Nukleális NFκB (önkényes egységekben)	80.7 ± 3.7	80.1 ± 4.1

Átlag ± SD. *p<0.048

A magas szérum koleszterin szintek agyi hatásáról igen keveset tudunk. A koleszterin anyagcseréje genetikus-metabolikus kontroll alatt áll és különbözőképpen szabályozott az egyes

szervekben. Kísérleteink szolgáltatták az első *in vivo* adatokat a koleszterin diéta transzkripciós faktorok aktivitására irányuló hatásáról a KIR-ben. Az APP transzkripciójának regulációjában is szerepet játszó AP-1 komplex (Lahiri és Ge 2004) a proto-onkogének, vagy immediate-early gének csoportjába tartozó c-jun és c-fos homo- és heterodimer egységeket is tartalmazza más faktorok: ATF-2, CREB stb. mellett. Ezeknek a komplexeknek többek között az oxidatív stressz indukált nekrotikus és apoptotikus sejthalál szabályozásában ismert a szerepük (Xu és mtsai 1997; Zana és mtsai 2006), a KIR-ben pedig az agyi iszkémia, következményes reperfüziós károsodás (Zwacka és mtsai 1998) és a gyulladásos folyamatok bizonyított mediátorai (Ahmad és mtsai 1998). A közelmúltban pedig BACE transzkripció reguláló hatásukat is igazolták (Sambamurti és mtsai 2004).

Eredményeinkhez hasonlóan, Galter és mtsai (1994) csökkent AP-1 kötődési kapacitást találtak oxidatív stressz hatására, de *in vitro* körülmények között. Mások ellentétes változásokról, emelkedett AP-1 kötő kapacitásról számoltak be szövettényésztéses kísérletekben, oxidatív stresszt követően (Peng és mtsai 1995; Xu és mtsai 1997; Li és mtsai 1998). Az eltérő eredményeket a különböző kísérletes rendszerek, pl. az eltérő oligonukleotid próbák használata is okozhatja.

Érdekes módon, az általunk vizsgált másik transzkripciós faktor, az NFκB kötődési aktivitása nem változott a koleszterin diéta hatására a nyulak KIR-ében. Ez a megfigyelésünk a két transzkripciós faktor eltérő szabályozási mechanizmusára utal. Eredményeinkhez hasonlóan, eltérő AP-1 és NFκB aktivást igazoltak más kísérletes rendszerekben is, különböző stresszorokat alkalmazva, *in vitro* körülmények között más szerzők (Sakurai és mtsai 1997; Zwacka és mtsai 1998). A miénkhez hasonló, *ex vivo* megfigyelés még nem volt ismeretes.

Az NFκB-ről tudjuk, hogy többek között az apoptózis regulációjában is szerepet játszik, és működése Ca^{2+} regulált folyamat (Choi és mtsai 2006). Az is ismert, hogy aktivációját a BAP és az AK patomechanizmusában is szerepet játszó gyulladásos folyamatok is kiválthatják (Valerio és mtsai 2006), ezért működésének modulációja új AK ellenes farmakostratégia (Collister és Albensi 2005). Az a megfigyelésünk, hogy az NFκB aktivitás nem változik a magas koleszterin diéta hatására a nyulak KIR-ben, arra utal, hogy a koleszterin diéta nem valószínű, hogy ezen a transzkripciós rendszeren keresztül fejti ki hatását.

Összefoglalva, elsőként az irodalomban, a koleszterin diéta divergáló hatásását mutattuk ki két agyi transzkripciós faktor működésére *in vivo* (Kálmán és mtsai 2001). Eredményeink szerint a KIR látszólagos lipid diétás rezisztenciája ellenére, a magas koleszterin tartalmú diéta a gyulladásos, immun, sejthalál folyamatok és az APP metabolizmus regulációjában fontos szerepet játszó AP-1 transzkripciós faktor aktivitását gátolja, az NFκB működésére azonban nincs hatással.

3.3. Hogyan hat a magas koleszterin tartalmú diéta az APP metabolizmusára apoB transzgenikus egerek agyában?

A KIR koleszterin anyagcseréjének AK-val kapcsolatos sajátosságainak vizsgálatára új vizsgálati megközelítést jelentett a transzgenikus állatok létrehozásának lehetősége (Spires és Hyman 2005; Bjelik és mtsai 2006a,b). A genetikailag tervezett vektorok segítségével a petesejtbe beültetett transzgén genomikus extra kópiája, transzkriptumának fokozott termelése olyan kísérletes paradigmák tervezésére ad lehetőséget, amelyek a természetben nem fordulhatnak elő, vagy jobban utánozhatják az embereken megfigyelt kóros jelenségeket.

Ennek megfelelően koleszterin etetéses kísérleteink következő szakaszában olyan génmanipulált egereket használtunk fel, amelyek az ateroszklerózis patofiziológiájának egyes sajátosságait modellálták. Előző kísérleteink gondolatmenetét folytatva, közvetlenül az APP gén expresszióját és a különböző APP izoformák arányát vizsgáltuk ezekben a kísérletes rendszerekben.

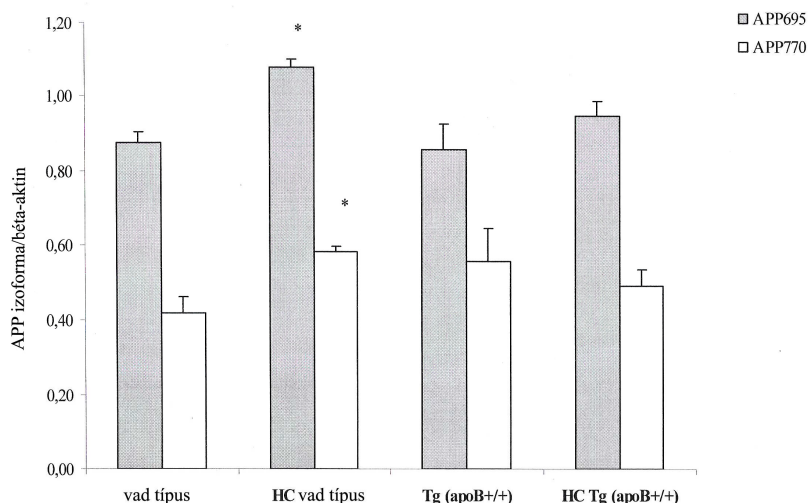
Elsőként az apoB gén beültetését választottuk (Bjelik és mtsai 2006a), mivel expresszáldó fehérjéről tudjuk, hogy az apoE mellett a koleszterin legfontosabb perifériás szállítója és nem expresszáldódik a KIR-ben, tehát segíthet bennünket annak a kérdésnek a vizsgálatában, hogy a periférián történő koleszterin anyagcsere változások hogyan nyilvánulnak meg, milyen hatással vannak az AK-t érintő KIR-i folyamatokra.

Emberben az apoB minden olyan lipoprotein komplexum (LDL, idLDL, VLDL) komponense, amely aterogén hatású (Kim és Young 1998). Jelenléte mindig kimutatható az ateroszklerotikus plakkokban. Az apoB családba több forma is tartozik, ezek közül emberben az apoB-48, és a kísérleteinkben vizsgált apoB-100-as az aterogén lipoprotein komplexek alapvető komponensei. Egérben más a helyzet, mivel ezen állatok lipoprotein profilja eltér az emberétől, hiszen esetükben a legtöbb koleszterint a HDL szállítja és tartalmazza. Az is fontos szempont, hogy az egerek normál helyzetben védettek az ateroszklerózissal szemben, csak genetikai és diétás kezeléssel lehet esetükben kiváltani hasonló eltéréseket (Breslow 1996). A különböző egértörzsek közül a C57B6-ot találták legfogékonyabbnak a diétás ateroszklerózis kialakulása szempontjából (Jawien és mtsai 2004), ezért választottuk ezt a törzset kísérleti paradigmánkhoz. E törzs apoB transzgenikus változata pedig különösen hajlamos az ateroszklerotikus jelenségek rapid kialakulására (Sanan és mtsai 1998).

Mivel humán vonatkozásban az apoE mellett az apoB a legfontosabb aterogén koleszterint szállító lipoprotein, továbbá – hasonlóan az apoE-hez – kimutatható a SzP-ban (Namba és mtsai 1992), és vérszintjei is emelkedettek az AK betegek esetében (Caramelli és mtsai 1999), kísérleteinkben koleszterin diétán tartott apoB transzgenikus és kontroll állatokat

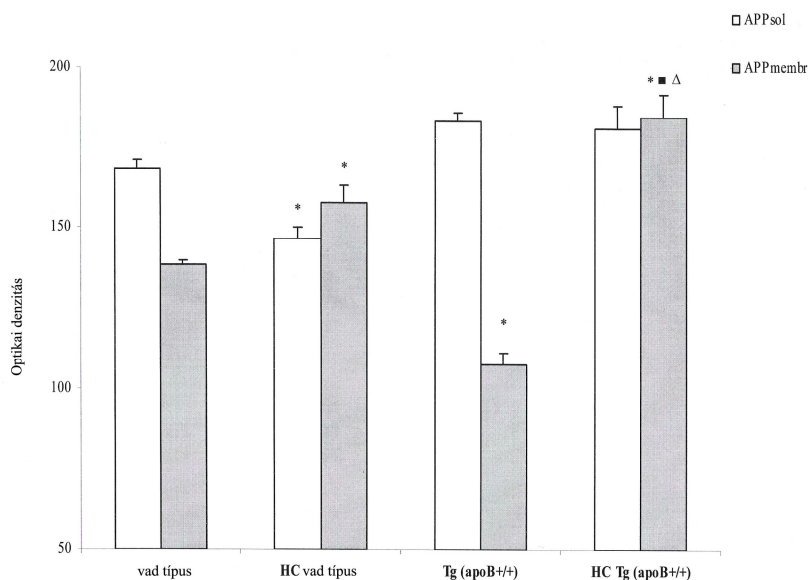
választottuk annak a kérdésnek a megválaszolása céljából, hogy ezek a perifériás koleszterin anyagcseréhez fűződő eltérések hogyan befolyásolják az AK szempontjából központi szerepet játszó APP gén transzkripcióját és expresszióját az agyban.

Eredményeink szerint a 17 hetes 2%-os koleszterin diétás kezelés csak az apoB transzgenikus egerek szérumban koleszterin szintjeit emelte meg szelektíven, és az apoB transzgen expressziója önmagában nem hatott a kísérleti állatok vér lipid profiljára (Bjelik és mtsai 2006a).



8. ábra APP/β-aktin hányadosok a kontroll (wild-type), humán apoB-100 transzgenikus (Tg /apoB^{+/+}/) és koleszterin diétán (HC) tartott egerek agyában. Az eredmények az optikai denzitások hányadosai. Átlag ± SEM (n=5) *p<0.05.

Elsőként sikerült igazolnunk, hogy a koleszterin diétás kezelés önmagában képes megemelni az APP695 és APP770-es RNS izoformák szintjeit a nem transzgenikus (ezért ateroszklerózis rezisztens) egerek agyában (8. ábra). Ezt a megfigyelésünket bizonyítéknak tekintjük arra vonatkozóan, hogy a vér (endogén vagy exogén okok miatt kialakult) magas koleszterin tartalma direkt vagy indirekt módon fokozott APP transzkripciót és expressziót eredményezhet az agyban, és a nagyobb mennyiségben termelt APP molekula így nagyobb lehetőséget ad arra, hogy kóros poszt-transzlációs processzingje révén BAP keletkezzen és rakódjon le szenilis plakkok formájában az AK betegek agyában.



9. ábra A szolubilis (APPsol) és a membrán kötött (APPmembr) APP frakciók optikai denzitás értékei a kontroll (wild-type), humán apoB-100 transzgenikus (Tg (apoB^{+/+})) és koleszterin diétán (HC) tartott egerek agyában. Átlag \pm SEM (n=5). A (*) KT csoporttal történő összehasonlítás viszonylatában, a (#) az apoB transzgenikus állatok viszonylatában, a (Δ) pedig koleszterin diétán tartott KT csoport viszonylatában számolt szignifikáns különbségeket ($p < 0.05$) jelzi.

Érdekes módon, az apoB gén fokozott expressziója önmagában, vagy a két hatás (fokozott apoB expresszió és magas koleszterin diéta) kombinált formában nem okozott további változásokat az agyi APP mRNS izoformák mennyiségében (8. ábra), tehát a koleszterin és apoB hatása nem additív jellegű. Ezt a megfigyelésünket nem tudjuk magyarázni további adatok hiánya miatt. Az irodalomban ismert egyetlen *in vitro* kísérlet szerint a neuronok koleszterin kezelése szövettenyészetben a teljes APP RNS mennyiségét csökkentette (Galbete és mtsai 2000). Az AK irányában KIR-i vonatkozásban jobban vizsgált apoE esetében nem találtak az egyes alléloknak megfelelően különbségeket az egyes APP RNS formák mennyisége között AK betegek agyában (Johnston és mtsai 1996).

7. táblázat A koleszterin diéta hatása a PKC és BACE szintekre (optikai denzitás, OD) kontroll (wild-type), humán apoB-100 transzgenikus (Tg /apoB^{+/+}) és koleszterin diétán tartott egerek agyában. Átlag \pm SEM (n=5).

	Vad típus		Tg (apoB ^{+/+})	
	Vad kontroll (n=5)	Koleszterin (n=5)	Tg kontroll (n=5)	Koleszterin (n=5)
PKC (OD) Szolubilis frakció	159.8 \pm 5.33	162.9 \pm 11.94	151.5 \pm 3.97	180.0 \pm 14.65
PKC (OD) Membrán kötött frakció	180.1 \pm 7.08	177.7 \pm 2.93	171.9 \pm 6.47	180.0 \pm 14.65
BACE (OD)	154.1 \pm 4.31	141.2 \pm 5.50	133.3 \pm 2.67	147.9 \pm 9.02

Kísérleteink második részében arra a kérdésre szerettünk volna választ kapni, hogy a koleszterin diéta és az apoB gén fokozott expressziója önmagában vagy kombinációs formában

hogyan változtatja meg az APP szubcelluláris lokalizációját az agyban. Az APP izoformák szolubilis és membrán kötött frakcióit vizsgálva azt találtuk (9. ábra), hogy a membrán kötött APP izoformák aránya szelektíven megemelkedett mind a KT, mind az apoB transzgenikus állatok agyában a koleszterin kezelés hatására, míg az apoB gén fokozott expressziója önmagában ellentétes hatást mutatott, azaz csökkentette a membrán kötött APP frakció arányát. Erre többfajta magyarázat lehetséges. Mivel az APP membrán integráns protein, membrán mikrokörnyezetét (fiziko-kémiai tulajdonságok), lipid doménekben, raftokban való elhelyezkedését módosíthatják a koleszterin anyagcsere változásai, és ezáltal változhat a szolubilis és membrán kötött frakcióinak aránya. Az érett APP-t normál esetben az (egyebek között PKC regulált) alfa szekretáz enzim hasítja, és többségében szolubilis izoformák keletkeznek a hasítás következtében (Weidemann és mtsai 1989). A szolubilis formák csökkent mennyisége tehát csökkent alfa-szekretáz működésre utalhat. Másrészt, a koleszterin anyagcsere változásai módosíthatják az APP poszt-transzlációs processzingjében részt vevő rendszerek működését is (Kálmán és Janka 2005a). Vizsgálataink harmadik szakasza ez utóbbi kérdés megválaszolására irányult (7. táblázat), és eredményeink szerint az APP poszt-transzlációs processzingjében szereplő két enzim, a PKC és a BACE mennyiségét nem módosította sem a koleszterin-kezelés, sem az apoB gén fokozott expressziója az egerek agyában. Eredményeink ellentmondanak Sidera és mtsai (2005) megfigyelésének, akik pozitív összefüggést találtak a koleszterin szintek és a BACE expresszió között *in vitro* körülmények között. A különböző kísérleti rendszerek is magyarázhatják a különbségeket.

Fontos megemlítenünk, hogy a szolubilis APP izoformák neuroprotektív hatását mutatták ki (Mattson és mtsai 1993). Ebből a szempontból értékelve is magyarázható a koleszterin káros hatása az agyra az AK folyamata szempontjából, hiszen eredményeink szerint csökkentette ezek mennyiségét az egerek agyában. Az apoB izolált hatása ebből a szempontból éppen ellentétesnek bizonyult. Az immunoblot kísérleteinkben az APP felismerésére használt ellenanyag nem adott sajnos lehetőséget a neuroprotektív és neurotoxikus szolubilis APP fragmensek elkülönítésére, ezért eredményeinkből nem következtethetünk az általunk vizsgált folyamatok neuroprotektív, vagy éppen toxikus jellegére.

Fontosnak tartjuk megemlíteni, hogy a kísérleteinkben leírt agyi metabolikus eltéréseket közvetve is okozhatta mind a koleszterin diéta, mind az apoB molekula fokozott expressziója az endotel sejtek károsodása, atheroszklerózis mediált folyamatok, a vér-agy gát károsodása, és számos más indirekt folyamat révén.

Összefoglalva, az irodalomban elsőként alkalmaztuk a humán apoB transzgenikus egér állatmodellt az agyi APP metabolizmus tanulmányozására (Bjelik és mtsai 2006a). Korábbi kísérleteinket kiterjesztve, újabb kísérletes állatmodellt alkalmazva erősítettük meg előző

megfigyeléseinket arra vonatkozóan, hogy a koleszterin anyagcsere perifériás változásai hatnak az KIR-i működésekre, módosítják az AK patomechanizmusában szerepet játszó biokémiai folyamatokat. In vivo eredményeink arra utalnak, hogy a koleszterin anyagcsere változásai módosítják az agyi APP expressziót és a fehérje szubcelluláris lokalizációját. Ez a hatás nem additív jellegű a hiperkoleszterinémiával. Kutatási eredményeink szerint az említett változások nem PKC és BACE mediált folyamatok.

3.4. A biglikán és az apoB izolált és közös expressziója transzgenikus egerekben hogyan hat az APP agyi transzkripciójára?

Az ateroszklerózist mind a VD, mind az AK rizikófaktoraként ismerjük (McConathy és mtsai 1997; Kálmán és mtsai 1998). Komplex folyamatának egyik elindítója a koleszterin gazdag lipoprotein molekulák szubendoteliális felhalmozódása (Olofsson és Boren 2005). O'Brien és mtsai (2005) bebizonyították, hogy többek között egy biglikán nevű vaszkuláris extracelluláris mátrix (ECM) proteoglikán molekula is felelős az aterogén lipoproteinek (apoB, LDL) endoteliális megkötéséért. A két molekulacsoport kölcsönhatása fiziko-kémiai természetű, hiszen a lipoprotein molekulák a glükózaminoglikán csoportok negatív töltésű szulfát és karboxil csoportjaival léphetnek kölcsönhatásba (Olofsson és Boren 2005). Ez a megfigyelés adta az ötletet kísérleteink további szakaszához, amelyben a biglikánnak, mint aterogén molekulának a szerepét vizsgáltuk a korábbi kísérletes paradigmáinkhoz hasonlóan, transzgenikus egerek agyának APP transzkripciójára. Ezekben a kísérleteinkben a humán biglikán és az apoB izolált és kombinált hatását vizsgáltuk a különböző APP mRNS izoformák agyi szintjeire, de koleszterin etetés nélkül.

8. táblázat Az APP695 és APP770 mRNA szintek a kontroll és humán biglikán transzgenikus /Tg (biglikán^{+/+})/, valamint kettős humán apoB-100 és biglikán transzgenikus /Tg (apoB^{+/-}, biglikán^{+/-})/ egerek agykérgében

	APP695		APP770	
	OD	%	OD	%
Kontroll	0.82±0.03	100	0.60±0.06	100
Transzgenikus (biglikán ^{+/+})	1.00±0.01*	122*	0.94±0.01*	157*
Transzgenikus (apoB ^{+/-} , biglikán ^{+/-})	0.79±0.01	96	0.76±0.02	127

OD: Optikai denzitás. Az elemszám minden csoportban 5. Átlag ± SEM. A százalék értékek a kontroll csoport eredményeihez viszonyítva. **p*<0.05.

Eredményeink szerint a biglikán gént expresszáló transzgenikus egerek agyában mind az APP695, mind az APP770 mRNS izoformák mennyisége megemelkedett (8. táblázat), de a 770-es izoforma mennyisége nagyobb mértékben, közel másfélszeresére nőtt. A kettős biglikán és apoB transzgenikus állatok agykérgében azonban normalizálódott ez az eltérés (8. táblázat).

Munkánkkal elsőként szolgáltatunk kísérletes bizonyítékot arra vonatkozóan, hogy egy extracelluláris mátrix molekula fokozott expressziója megváltoztatja az APP izoformák KIR-i arányát, és így szerepe lehet mind az AK, mind a VD patomechanizmusában (*Bjelik és mtsai 2006b*).

A proteoglikánok csoportjának más képviselőiről, a HSPG-ről már korábban bizonyították, hogy regulálják az APP expressziót (Scholefield és mtsai 2003). A lipoproteinek endoteliális megkötéséért felelős ECM-ek szintén hatnak az APP biogenezisére és az amiloidogén béta fragmensek kialakulására (Bronfman és mtsai 1996). A HSPG-nak más szerepük is ismert az AK patomechanizmusában. Snow és mtsai (1988) kimutatta jelenlétüket mind a SzP-ban, mind az NFF-ban. Az is ismert, hogy az APP molekula legalább négy HSPG kötőhellyel rendelkezik (Clarris és mtsai 1997), valamint, hogy a magas szulfáttartalmú PG-ok elősegítik az APP amiloidogén hasítását (Leveugle és mtsai 1997). A biglikánnal kapcsolatosan azonban nem rendelkezünk az APP vonatkozásában ilyen adatokkal. Az egyetlen tény, ami ismert volt, hogy ez az endoteliális sejtekből származó molekula kis affinitással ugyan, de képes a BAP megkötésére (Snow és mtsai 1995).

Az APP gén alternatív splicing-ja során háromfajta APP molekula keletkezhet. Nagyság szerint 770, 751 és 695-ös izoformákat ismerünk, melyek normál aránya a humán agyban 1:10:20 (Tanaka és mtsai 1989). Ezek mind tartalmazzák a BAP fragmens szekvenciáját is, tehát potenciálisan mindegyik forma lehet amiloidogén.

Jelen eredményeink és az említett korábbi megfigyelések arra utalnak, hogy az ECM molekulák az amiloidogén irányba módosítják az APP metabolizmust az agyban már a mRNS szintjén is, hiszen főleg az APP770-es mRNS izoformák mennyiségét emelik meg. A neuropatológiai vizsgálatok bizonyították, hogy szelektíven ennek az izoformának a mennyisége nő meg az AK betegek agyában is, a 695-ös izoforma mennyisége pedig csökken (Rockenstein és mtsai 1995). Kísérletünkben a humán biglikán gén izolált expressziója tehát az AK-hoz hasonló mRNS arányokat hozott létre a transzgenikus egerek agyában.

Az AK patomechanizmusának jobb megértése és potenciális új terápiás lehetőségek kidolgozása szempontjából lehet érdekes az a megfigyelésünk, hogy a kettős biglikán és apoB transzgenikus egér esetében normalizálódott az AK-ra jellemző 770/695 APP mRNS izoforma hányados. Ez az eredményünk megerősíti korábbi kísérletünk adatait arra vonatkozóan, hogy az apoB transzgén expressziója nincs hatással a APP 770/695 mRNS hányadosra (*Bjelik és mtsai 2006a*), továbbá arra utal, hogy az apoB expressziója védő hatású lehet az APP gén amiloidogén splicing-ja szempontjából. Ennek a kérdésnek megválaszolásához azonban további kísérletek szükségesek, melyek nem csak az RNS, hanem proteinek szintjén vizsgálják ezt a folyamatot.

Összefoglalva kísérleteink eredményeit, elsőként igazoltuk, hogy az ateroszklerózis

patomechanizmusában központi szerepet játszó proteoglikán és lipoprotein molekulák expressziója hat a KIR-i APP expresszióra és splicing-ra (Bjelik és mtsai 2006b). A humán biglikán, mint ECM, elősegíti az APP amiloidogén splicing-ját, míg az apoB expressziója nem módosítja ezt a folyamatot, vagy éppen protektív hatású. Eredményeink megerősítik a vaszkuláris tényezők szerepét az AK feltételezett patomechanizmusában, továbbá az AK és a VD közös mechanizmusaira hívják fel a figyelmet.

3.5. Milyen az AK betegek trombocitáinak membrán fluiditása és plazma MDA szintje?

Zubenko és mtsai 1987-ben számoltak be arról, hogy az AK betegek trombocita membránjai fiziko-kémiai tulajdonságaikban, membrán fluiditásukban eltérnek a KT személyektől. Ezt a megfigyelést más munkacsoportok is megerősítették (Hicks és mtsai 1987; Piletz és mtsai 1991; van Rensburg és mtsai 1992), továbbá az AK betegek hippocampális membrán preparátumaiban is hasonló eltéréseket, fokozott membrán fluiditást találtak (Zubenko és mtsai 1986). A trombocita membránok fokozott membrán fluiditását a korai kezdetű familiáris formák esetében találták kifejezettebbnek (Zubenko és mtsai 1987), lehetséges autoszóm öröklésmenettel (Chakravarti és mtsai 1989), és az eltérés a korai demencia kezdet jó prediktorának bizonyult (Zubenko és mtsai 1988). Más szerzők azonban nem tudták megerősíteni az eredményeket (Kukull és mtsai 1992). Az AK amiloid hipotézise szempontjából az is fontos szempont, hogy a BAP és származékai interakcióba lépve a membránokkal, önmagukban is képesek a fluiditást módosítani, rigidizációt okozhatnak (Eckert és mtsai 2005).

Vizsgálatainkban az említett szerzők megfigyeléseiből kiindulva léptünk tovább, és háromféle membrán jelölőt párhuzamosan alkalmazva térképeztük fel az AK-os betegek trombocita membránjainak különböző töltésű régióit (Kálmán és mtsai 1994). A DPH a membránok hidrofób magjában helyezkedik el, a TMA-DPH a negatívan töltött membrán doméneket, régiókat (a membránok belső oldala) jelöli, a DPH-PA pedig a pozitív töltésű sejtfelszíni domének fluiditás változásairól ad információt.

Az AK trombociták membrán fluiditását vizsgálva, több kérdésre szerettünk volna választ kapni: 1. Reprodukálhatóak-e a Zubenko munkacsoport eredményei magyar sporadikus AK-os betegeket vizsgálva? 2. Van-e különbség a sporadikus és pozitív familiáris demencia anamnézisű betegek trombocitáinak membrán fluiditásában? 3. Az AK trombocita membránok egyes, különböző töltésű doménjei különböznek-e fluiditásuk tekintetében? 4. A trombocita membránok fluiditásának esetleges eltérései kapcsolatba hozhatók-e olyan lipid peroxidációs paraméterrel, mint a plazma MDA szintje?

DPH fluoreszcens próbát alkalmazva, eredményeink megerősítik a korábbi vizsgálatok adatait, azaz mind a pozitív-, mind a negatív családi anamnézisű AK-os betegek trombocita

membránjai fluidabbaknak bizonyultak a membránok középső rétegében, mint a KT személyeké. A DPH-val mért membrán fluiditás alapján azonban nem lehetett a két AK alcsoportot elkülöníteni egymástól.

Az AK és KT trombocita membránok fluiditási eredményeit a 9. táblázat foglalja össze.

9. táblázat Kontroll és Alzheimer-kóros betegek trombocita membrán preparátumainak fluoreszcens anizotrópia értékei.

Fluoreszcens festék	Kontroll (n=26)	Alzheimer-kór a családi anamnézisben	
		Negatív családi demencia anamnézis	Pozitív családi demencia anamnézis
DPH	0.265±0.020	0.226±0.021*	0.238±0.016*
TMA-DPH	0.288±0.024	0.292±0.026	0.295±0.019
DPH-PA	0.295±0.030	0.286±0.028	0.326±0.031*

* $p < 0,05$

A membránok belső, negatívan töltött doménjeit jelölő TMA-DPH-t alkalmazva nem találtunk különbségeket az egyes csoportok között. A külső, pozitívan töltött rétegek membrán fluiditása azonban szignifikánsan csökkent volt, de csak a pozitív családi demencia anamnézissel rendelkező AK-os betegek esetében.

Mivel a membránok fluiditásának csökkenését komponenseik peroxidációja is okozhatja (Dobretsov és mtsai 1977), méréseink második szakaszában a vizsgálati személyek plazma MDA szintjeit határoztuk meg. (10. táblázat).

10. táblázat Plazma malondialdehid (MDA) szintek a kontroll és Alzheimer-kóros betegek vérében.

	Alzheimer-kór		
	Kontroll (n=26)	Negatív családi demencia anamnézis	Pozitív családi demencia anamnézis
MDA (nM/ml)	11.59±2.45	10.98±3.26	12.29±1.92

Az MDA szintek tekintetében nem találtunk szignifikáns különbségeket egyik vizsgálati csoportban sem. Eredményeink arra utalnak, hogy az AK trombociták membránjának fluiditás eltérései valószínűleg közvetlenül a membrán komponensek fiziko-kémiai tulajdonságainak változásaira, nem pedig a plazma általunk vizsgált változóival vannak összefüggésben.

Bár az itt bemutatott trombocita membrán fluiditás méréseink óta 13 év telt el, az ide vonatkozó eredményeink az utóbbi évek AK koleszterin hipotézisével kapcsolatos megfigyeléseinek tükrében új jelentőséget nyertek. Az azóta felhalmozódott ismereteink alapján a membránok fluiditás eltérései akár a KIR-ben, akár a trombociták esetében, egyre több, az APP sejtmembránokhoz kötött metabolizmusával és az AK amiloid hipotézisével összefüggő közvetlen és közvetett kapcsolatra utalnak (Kálmán és Janka 2005a). A trombocitákat több

szempontból is az AK perifériás modell rendszerének tekintjük: alfa granulumaikban nagy mennyiségben tárolják, és aktivációjuk során fel is szabadítják az APP-t (Van Nostrand és mtsai 1990; Skovronsky és mtsai 2001). A különböző APP izoformák kimutathatóak a trombocita membránokban normál személyek és AK-os betegek esetében is, és arányaik változása AK specifikusnak bizonyult (Di Luca és mtsai 1998). Ezen kívül, a trombociták az APP poszt-transzlációs processzingjéhez szükséges enzimekkel, specifikus szekretázokkal is rendelkeznek (Colciaghi és mtsai 2004). Jans és mtsai (2006) pedig bebizonyították, hogy az ateromában lerakódó trombociták APP-t szabadítanak fel, melyből BAP is keletkezik, és a többi mediátorral együtt ezek az amiloidogén peptidek is részt vesznek a makrofágok működésének szabályozásában, és az ateroszklerotikus plakkok kialakításában. A trombociták tehát egyrészt az AK modell rendszerének is tekinthetők, másrészt a VD és AK közös patomechanizmusának szereplői is.

Továbbá, a membrán komponensek közül a koleszterinről is ismert, hogy szerepet játszik a sejtmembránok fluiditásának regulációjában, befolyásolva az ide lokalizálódó szignalizációs és transzport folyamatokat (Simons és Ikonen 1997; Puri és mtsai 1999; Sing és mtsai 1999; Suzuki 2002). Ha a sejtmembrán koleszterin tartalma emelkedik, fokozódik rigiditása (ezt tapasztaltuk az AK trombociták membránjai esetében DPH-PA jelölőt alkalmazva a betegek egy alcsoportjánál), és csökkenhet permeabilitása a vízdékony molekulák számára. A koleszterin részt vesz a sejtmembrán kompartmentumok, a raftok kialakításában is. A raftokban a szfingolipid molekulák szénhidrát láncai közé beágyazódó koleszterin molekulák tömörítik a membránt, rendezett folyadék fázisokat hozva létre befolyásolják annak polaritását és a szignalizációs folyamatokat, módosíthatják a membrán integráns fehérjék pl. az APP molekula és hasító enzimjei, az alfa béta és gamma szekretázok funkcionális állapotát, működését (Sankaram és Thompson 1990; Smart és mtsai 1999).

Ha a neuronális membránok folyékony mozaik modelljében gondolkodunk, nem csak a horizontális, hanem a vertikális kompartmentalizáció is, azaz a sejtmembránok rétegeinek koleszterin tartalma is meghatározó jelentőségű lehet a membránok működése szempontjából, és az életkorral is változik. Fiatalkorban mind az exo-, mind az endoplazmatikus membrán réteg koleszterin tartalma alacsony az öregedés során a koleszterin egyre jobban az exoplazmatikus oldalon halmozódik fel, annak rigiditását fokozva (ezt találtuk a pozitív családi anamnézisű AK betegeink trombocitái esetében). Ha az AK amiloid hipotézisét vesszük alapul, könnyen beláthatjuk, hogy ez a folyamat a korábban említett szempontok alapján a BAP felhalmozódást segíti elő.

A kísérleteinkben megfigyelt eltérések, azaz a sejtmembránok fluiditásának változása az APP molekula poszt-transzlációs processzingjében résztvevő enzimek működését is

befolyásolhatja. A magas koleszterin szint és következménye a rigidebb sejtmembrán gátolhatja az alfa szekretáz működését (Simons és mtsai 1998; Frears és mtsai 1999, Fassbender és mtsai 2001). Másrészt a sejtmembránok fluiditásának fokozódása a koleszterin tartalmuk csökkenése révén gátolhatja az APP endocitózist is, és így az nagyobb eséllyel bontódhat le a sejtmembrán alfa szekretázai révén (Racchi és mtsai 1997).

Összefoglalva, a trombocita membránok középső rétegének fluiditás fokozódását mutattuk ki pozitív és negatív demencia családi anamnézisű magyar AK-os betegek esetében (Kálmán és mtsai 1994), megerősítve a korábbi adatokat. Elsőként bizonyítottuk, hogy a pozitív demencia családi anamnézisű AK-os betegek trombocita membránjainak külső rétege csökkent fluiditású. A vérplazma MDA szintjei (lipid peroxidációs metabolit) nem mutattak összefüggést a membránok fizikai tulajdonságainak változásával. Eredményeink magyarázhatják az AK-os betegek trombocitáinak APP metabolizmus eltéréseit.

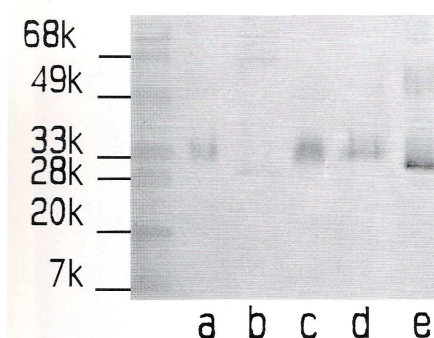
3.6. Kimutatható-e az apoD az AK-os betegek agyában, és ha igen, jelenléte kapcsolatba hozható-e a neurodegeneráció vagy az öregedés folyamatával?

A koleszterin transzportjában az apoE mellett más lipoproteinek is részt vesznek. Az apoD a HDL komplexumok részét képezi és elsősorban a reverz koleszterin transzportban van szerepe, tehát a szövetekből a májba szállít (McConathy és Alaupovic 1973, 1976). Az apoD szerkezetileg eltér a többi lipoproteintől, ezért a koleszterinen kívül többféle hidrofób molekula szállítására is képes, mint pl. az arachidonsav, bilirubin, szteroid hormonok (Drayna és mtsai 1986; Peitsch és Boguski 1990). Expressziója általános a szervezetben, de különösen a vérben, és az emlőben mutatható ki nagy mennyiségben (Lea 1988; Balbin és mtsai 1990). Az agyban is expresszálódik, főleg a gliasejtekben és a perivaszkuláris endotél sejtekben van jelen (Smith és mtsai 1990). A fehérje KIR-i funkcióiról nagyon keveset tudunk, de többek között kapcsolatba hozzák a koleszterin tárolási betegségek, pl. a Niemann-Pick betegség és a spongiform encephalopátiák feltételezett patomechanizmusával (Dandoy-Dron és mtsai 1998; Suresh és mtsai 1998).

Az utóbbi évek kutatásai számos összefüggést igazoltak a koleszterin anyagcsere zavarával járó Niemann-Pick betegség C variánsa és az AK között, hiszen az NPB-C-ben is kialakulnak az agyi amiloid depozitumok a koleszterin és az APP közös vezikuláris transzport zavara miatt (Jin és mtsai 2004; Kálmán és Janka 2005a). Mivel az apoD-nek a koleszterin transzportban és a neuronális regenerációs folyamatokban tulajdonítanak szerepet (Boyles és mtsai 1990), ezért az AK szempontjából is fontos lehet. Az egyetlen korábbról ismert adat Terrisse és munkatársaitól (1998) származik, akik emelkedett likvor és hippokampális apoD szinteket találtak AK-ban, de az elváltozás nem volt betegség specifikus, hiszen más KIR-i betegségekben is jelen volt pl. cerebrovaszkuláris és motoneuron betegségekben és

meningoencephalitisben. Az apoD szubcelluláris és celluláris lokalizációjáról, az AK neuropatológiai sajátosságaihoz való viszonyáról azonban nem rendelkezünk adatokkal. Morfológiai és biokémiai vizsgálatunk célja ezért az apoD KIR-i lokalizációjának feltérképezése volt, különös tekintettel a normál öregedés és az AK vonatkozásaira (Kálmán és mtsai 2000a).

Immunoblot vizsgálatunk szerint az agyminták apoD fehérjéjének molekulásúlya eltért a többi szövetmintáétól. Elsőként igazoltuk, hogy a humán agy egy 29 kD molekulásúlyú izoformát tartalmaz, szemben a többi szövetben (humán szérumban, likvorban, emlő ciszta folyadékban) található 32 kD molekulásúlyú izoformákkal (10. ábra). A szemikvantitatív immunoblot méréseink szerint az AK és idős KT betegek agymintáinak apoD fehérje tartalma nem különbözött.



10. ábra Az apoD immunoblot a: humán szérumban, b: agykéregben, c: agyi ciszta folyadékban, d: likvorban, e: emlő ciszta folyadékban.

Immunohisztokémiai vizsgálatunk eredményei szerint a normál, fiatal humán agyban a fehérállomány oligodendrocitái mutattak szórványos citoplazmatikus apoD festődést, az agykéreg neuronjai és asztrocitái azonban nem jelölődtek. Csak néhány gyengén festődő sejt volt kimutatható a kortex granuláris és piramis rétegeiben mindenfajta lokalizációs preferenciától függetlenül. A plexus choroideus és a perivaszkuláris sejtek is csak gyengén festődtek, az agyi erek endotel sejtjei pedig egyáltalán nem mutattak jelölést. A cerebellum asztrocitáiban és oligodendrogliaiban azonban erős apoD pozitivitást találtunk, de a kisagyi neuronok, Purkinje-sejtek, és a granuláris réteg neuronjai nem mutattak immunopozitivitást a fiatal KT személyek kisagyában.

Az AK-os és idős KT személyek agyában jelentős variabilitást találtunk az immunreaktivitás pozitivitása és intenzitása, a festődött sejtek lokalizációja és típusa tekintetében. A hét vizsgált AK-os betegből három esetében nem, vagy alig találtunk pozitív festődést, ezért a tervezett immunohisztokémiai kvantifikálástól el kellett tekintenünk. A következő tendencia-szerű elváltozásokat figyeltük meg azonban:

Az idős KT személyek agykérgében több volt az apoD immunreaktív asztrocita és neuron mint a fiatalokéban. Az apoD immunreaktív asztrociták a kéreg felső rétegeiben, a granuláris és molekuláris rétegeknek megfelelően helyezkedtek el. A fiatalokénál több volt a

pozitív festődésű sejt a fehérállomány oligodendrocitái esetében is. Mind az oligodendrogliaokban, mind az asztrocitákban citoplazmatikus festődést találtunk, a nukleusz és a sejtmembrán nem jelölődött. A kortikális neuronok közül főleg a lipofuscin tartalmú sejtek bizonyultak pozitív festődésűnek. Az axonok és az apikális dendritek esetében nem találtunk jelölést. Azoknál az AK-os személyeknél, akiknél apoD pozitivitást találtunk, a festődés mértéke erősebb volt, mint az idős KT személyek esetében. Az apoD immunopozitivitás nem mutatott topológiai kapcsolatot sem a szenilis plakkokkal és környezetükkel, sem az NFF-ok jelenlétével. Az AK-os betegek esetében a temporo-parietális kortextben több apoD immunopozitív asztroglia és neuronális sejtet találtunk, mint az idős KT személyeknél, de az említett nagy egyéni különbségek miatt az eredmények kvanifikálására nem volt lehetőség.

Immunhisztokémiai festéssel elsőként igazoltuk, hogy az apoD kimutatható a humán agyban. Eredményeink szerint főleg a gliasejtek, asztrociták, oligodendroglia sejtek festődnek, a neuronok esetében pedig a piramis és Purkinje-sejtek jelölődnek. Mindkét sejtcsoportra a citoplazmatikus apoD festődés a jellemző. Hasonló celluláris és szubcelluláris lokalizációt mutattak ki más specieszek esetében is (Smith és mtsai 1990; Provost és mtsai 1990, 1991; Seguin és mtsai 1995). Eredményeink megerősítik a korábbi adatokat arra vonatkozóan, hogy az apoD a KIR-ben is termelődik. Az *in vitro* adatok szerint az apoD-t főleg a gliasejtek, asztrociták termelik (Patel és mtsai 1995). Mivel az apoD a vérben is jelen van, ezért a VAG-on átjutva is bekerülhetne az agyba. Adataink szerint az endoteliális és perivaszkuláris sejtek nem festődtek, ezért ez a feltételezés kevésbé valószínűsíthető. Másik fontos megfigyelésünk, hogy az agyi apoD molekulásúlya eltér a más szervekben pl. vérben találtakétól, sem támasztja alá KIR-i származásának hematogén eredetét. Bár az is lehetséges, hogy a vérből származó apoD a KIR-ben további poszt-transzlációs modifikáción megy keresztül, és így alakul ki az általunk megfigyelt agy specifikus izoforma.

A nagy egyéni különbségek ellenére AK-os betegekből származó minták nem kvantifikált, szubjektív megítélésünk szerint erősebben festődtek mint az idős KT személyeké és ez megerősíti a Terrisse munkacsoport (1998) hippokampális adatait. Szemikvantitatív Western-blot vizsgálatunk (az idős KT és AK-os betegek temporális kortex agymintáit hasonlítottuk össze) negatív eredménye valószínűleg a nagy inter-individuális különbségekre vezethető vissza, és összhangban áll Harr és mtsai (1996) negatív eredményű génexpressziós vizsgálataival AK-os betegek agymintáiból.

Az a megfigyelésünk, hogy főleg a lipofuscin pozitív kortikális neuronok festődtek apoD-vel, arra utal, hogy az apoD jelenléte nem az AK, hanem inkább az öregedés specifikuma. Az a tény pedig, hogy az apoD fokozott mértékben mutatható ki az idősödő és az AK-os betegek agyában, valamint más KIR-i károsodással járó folyamatokban, azt jelzi, hogy az apoE-hez

hasnolón ez a molekula is szerepet játszik a neuronális regenerációban. Ismert ligandjai alapján feltételezhetjük, hogy elsősorban a pusztuló sejtalkotó molekulák eltakarítását végzi.

Összefoglalva, kísérleteink elsőként szolgáltattak bizonyítékot arra vonatkozóan, hogy az apoD egy specifikus izoformája fordul elő a humán agyban. Immunhisztokémiai módszerrel elsőként mutattuk ki, hogy a humán agyban mind a neuronok, mind a gliasejtek tartalmazhatnak apoD molekulákat kis mennyiségben normál körülmények között, és nagyobb mennyiségben a korral járó agyi folyamatok részeként (Kálmán és mtsai 2000a). Vizsgálataink megerősítették, hogy az apoE-hez hasonlóan, ennek a lipoprotein molekulának is szerepe lehet a neuronális degeneratív és regenerációs folyamatokban, de jelenlétét nem találtuk specifikusnak az AK neuropatológiája szempontjából.

3.7. Milyen mértékű rizikótényező az apoE génjének polimorfizmusa a magyar AK-os betegek esetében? E4-es alléljának öröklése rizikónak minősül-e más neuropszichiátriai betegségekben (VD, expresszív beszédfejlődési zavar)?

Az apoE-nek a periférián történő koleszterin szállítás mellett központi szerepe van a KIR lipid anyagcseréjének szabályozásában is (Kálmán és Janka 1996a; Kálmán és Janka 2005a; Mahley és mtsai 2006a,b). Olyan specifikus idegrendszeri hatásokkal rendelkezik továbbá, mint az idegi nyúlványok növekedésének elősegítése, a szinaptikus plaszticitás modulációja, neuroprotektív hatás, részvétel a neuronális javítási, karbantartási folyamatokban, a BAP eltakarításának elősegítése és a tau protein fokozott foszforilációjának gátlása (Mahley és mtsai 2006a,b).

Molekuláris biológiai szempontból az apoE egy polimorf molekula, melynek a normál populációban előforduló három leggyakoribb allélja a kaukázusi populációban előfordulási gyakoriság sorrendjében: apoE3 > apoE4 > apoE2 (Davignon és mtsai 1988, Hallman és mtsai 1991, Császár 1997). Az apoE allélok gyakorisága a különböző emberfajták között jelentős különbségeket mutat (Davignon és mtsai 1988).

Az apoE gén E4-es alléljának öröklése egyedül és az AK más rizikótényezőivel közösen befolyásolja a demencia szindróma kezdetének időpontját, progressziójának sebességét és prognózisát (Saunders és mtsai 1993; Strittmatter és mtsai 1993; Kálmán és Janka 1996a; Kálmán és Janka 2005a; Palotás és Kálmán 2006). Az E4-es allél öröklése rizikótényezőként szerepel mind a sporadikus, mind a familiáris AK formák kialakulása szempontjából (Saunders és mtsai 1993; Strittmatter és mtsai 1993; Németh és mtsai 1995), bár Lahiri és mtsai (2004) jelentős etnikai különbségeket találtak a rizikó nagyságát illetően, és annak a lehetőségét is felvetik, hogy nem minden etnikumban minősül AK rizikójának. Az E4-es allél például egészséges emberek esetében igen magas 30-37%-os gyakorisággal fordul elő az afrikai

(Sepehrnia és mtsai 1988) és új-guineai (Kamboh és mtsai 1990) személyek között, míg más emberfajták esetén (pl. maja indiánok) gyakorisága nem éri el a 10%-ot (Kamboh és mtsai 1991; Schmitt és Estus 2004). Mivel a normál európai populáció az apoE allél megoszlása szempontjából különösen heterogén (Hallman és mtsai 1991), ezért tartottuk fontosnak meghatározni a magyar AK-os betegek apoE polimorfizmusát. Az apoE és a demenciák kapcsolatára irányuló első vizsgálatunk célja ezért a E4-es allél gyakoriságának meghatározása volt a magyar sporadikus típusú AK populáció esetében (Kálmán és mtsai 1996a,b, 1997). Eredményeinket a 11. táblázat foglalja össze.

11. táblázat Az apoE allél frekvenciák megoszlása a normál és beteg kontroll valamint Alzheimer kóros személyeknél.

apoE allél típus	Normál kontroll (n=71)	Beteg kontroll (n=60)	Alzheimer demencia (n=50)
E2	6%	10%	10%
E3	87%	81%	62% [#]
E4	7%	9%	28% [*]

[#] $p < 0.001$, ^{*} $p < 0.02$ Kruskal-Wallis próba. Az allél frekvenciák az adott allél százalékos gyakoriságát tükrözik a homo- és heterozigóta esetek előfordulását összesítve.

Az apoE4 allél gyakoriságát szignifikánsan nagyobbak találtuk a magyar késői, sporadikus típusú AK populáció esetében, mint a normál és beteg kontroll csoportokban. Eredményeink összhangban vannak a nemzetközi és korábbi hazai irodalmi adatokkal (Kamboh 1995; Németh és mtsai 1995), ahol a késői, 65 év feletti kezdetű AK esetében 24-47%-os E4 allél gyakoriságot írtak le.

Az egyes vizsgálatok eredményei közötti nagy különbségek részben a beteg beválogatási szempontok különbségeiből adódhatnak, hiszen az AK klinikai diagnózisa csak valószínűségi és a neuropatológiai vizsgálatok adatai szerint még legszerencsésebb esetben is csak 90%-os találati biztonságu. Fontos megemlítenünk, hogy Zubenko és mtsai (1994), Peacock és Fink (1994), valamint Corder és mtsai (1994) tanulmányaikban a kórbonctani vizsgálat alapján megerősített AK diagnózisú személyeknél az E4 allél gyakoriságot 40% körüli értéknek találták. Ez az érték jóval magasabb, mint az általunk mért gyakoriságok.

Eredményeink megerősítik Németh és mtsai (1995) korábbi hazai vizsgálatának adatait, azaz a többi európai kaukázusi népcsoportnak megfelelő apoE E4 allél gyakoriság jellemzi a magyar, késői kezdetű, sporadikus AK betegeket (Kálmán és mtsai 1996a,b, 1997).

A VD és az AK a két leggyakoribb demenciaforma, de a két betegség kapcsolata, összefüggései alig tisztázottak. Számos nagy epidemiológiai keresztmetszeti és nyomonkövetéses vizsgálat (Framingham, Honolulu-Ázsia, Rotterdam) bizonyította, hogy a cerebrovaszkuláris betegségek növelik az AK rizikóját (White és mtsai 2002; Tan és mtsai 2003; Ott és Grace 1997) illetve, hogy a komorbiditásuk gyakori (Az apáca vizsgálat, Snowdon és

mtsai 1996).

Az apoE, mint koleszterin szállító fehérje, funkcióból adódóan részt vesz a kardiovaszkuláris betegségek patomechanizmusában, polimorfizmusa, az E4 allél öröklése pedig bizonyított kardiovaszkuláris mortalitási rizikó (Hofman és mtsai 1997; Breteler és mtsai 1998). Ezek alapján joggal feltételezhetnénk, hogy az E4-es allél a VD rizikógénjeként is szerepel, de az ide vonatkozó adatok nem meggyőzőek és ellentmondásosak: olasz, spanyol és japán VD populációkban emelkedett E4 allél gyakoriságot találtak (Shimano és mtsai 1989; Pedro-Botet és mtsai 1992; Noguchi és mtsai 1993; Frisoni és mtsai 1994; Myers és mtsai 1996), míg ugyanezen országok más populációiban nem volt reprodukálható ez az összefüggés (Kawamata és mtsai 1994; Sakoda és mtsai 1994; Scacchi és mtsai 1995).

Mivel az európai népcsoportok között az apoE polimorfizmusa nagyon eltérő (Lahiri és mtsai 2004), és magyar adatok sem ismertek korábban a VD betegek apoE polimorfizmusát illetően, következő vizsgálatunk célja egy VD alcsoport, a szubkortikális VD betegek vizsgálata volt (Kálmán és mtsai 1998). Eredményeinket a 12. táblázat mutatja be.

12. táblázat Az apoE genotípusok és frekvenciák megoszlása kontroll és vaszkuláris demens személyeknél.

Genotípus	Kontroll (n=79)	Vaszkuláris demencia (n=34)
	Gyakoriság %	
2/2	-	-
2/3	9 (11%)	1 (3%)
3/3	59 (75%)	21 (62%)
3/4	10 (13%)	9 (26%)
4/4	1 (1%)	1 (3%)
2/4	-	2 (6%)
Allél		
E2	6%	5%
E3	87%	76%
E4	8%	19%*

Fisher teszt * $p < 0.03$, ($t = 4.394$)

Az irodalomban elsőként számoltunk be arról, hogy az AK-hoz hasonlóan, szubkortikális VD-ban az E4-es allél szignifikánsan gyakoribb, mint a KT személyeknél a magyar populációban (Kálmán és mtsai 1998). A VD betegek E4-es allél gyakoriság tekintetében a KT és az AK betegek értékei (28% saját adataink szerint, 11. táblázat) között helyezkednek el.

Az apoE E4 alléljának öröklése önmagában nem elégséges és nem szükséges tényező sem az AK, sem a VD kialakulásához, ezért környezeti és más genetikus hatások interakcióját feltételezzük (Palotás és Kálmán 2006). Azok a személyek, akik E4 allél hordozók, és olyan cerebrovaszkuláris rizikófaktorokkal rendelkeznek, mint hiperlipidémia, ateroszklerózis, cerebrovaszkuláris és perifériás érbetegség, diabétesz mellitusz, nagyobb az esélyük a kognitív hanyatlásra, mint akik nem örökölték E4-es allélt, vagy nem rendelkeznek vaszkuláris

rizikófaktorokkal (Kalmijn és mtsai 1996; Haan és mtsai 1999; *McConathy és mtsai 1997; Kálmán és mtsai 1999*).

E4 allél gyakorisági eredményeink ellentmondanak több újabb irodalmi adatnak is (Catto és mtsai 2000; Luthra és mtsai 2004). Ez azzal magyarázható, hogy a VD igen heterogén betegségcsoport, melybe számos igen eltérő mechanizmusú, klinikumú szindróma tartozik. A Rotterdam vizsgálat adatai például felhívják a figyelmet arra, hogy az E4-es allél öröklése a VD rizikójának tekinthető, de a stroke esetében már nem mutatható ki ez az összefüggés (Slooter és mtsai 2004). Ráadásul nemcsak az AK, hanem a VD esetében is lehetnek diagnosztikus bizonytalanságok a modern agyi képalkotó eljárások pontossága ellenére is. Az is ismert, hogy jelentős mértékű átfedés fordul elő az AK és a VD között, amely tovább fokozhatja a klinikai diagnózis bizonytalanságát.

Másrészt, több tanulmány igazolta az E4-es allél öröklése, a kardiovaszkuláris rizikófaktorok (hipertónia, hiperglikémia) és az időskori kognitív hanyatlás közötti kapcsolatot (Carmelli és mtsai 1998; Peila és mtsai 2001; Janka és mtsai 2002), és ezek a megfigyelések megerősítik a kis elemszámú, de homogén betegcsoporton végzett vizsgálatunk eredményeit arra vonatkozóan, hogy az E4 allél öröklése és a VD között kapcsolat létezik.

Eredményeink értékét, megbízhatóságát csökkenti a kicsi elemszám, hiszen összesen 34 szubkortikális vaszkuláris demens beteget genotipizáltunk. Azt is figyelembe kell venni, mint következtetéseink erősségét korlátozó tényezőt, hogy a VD diagnózisa csak klinikai jellegű volt, neuroradiológiai képalkotó vizsgálatok igen, de neuropatológiai vizsgálatok nem történtek a vizsgálati személyeknél.

Az apoE molekula nem csak a neurodegeneratív betegségek szempontjából fontos, hanem olyan KIR-i funkciók szabályozója, mint a fejlődés és tanulás, hiszen szerepét igazolták a neuronális differenciálódási folyamatokban és a szinaptikus plaszticitás fenntartásában is (Mahley és mtsai 2006a,b).

Az expresszív beszédfejlődési zavar egy olyan gyermekpszichiátriai megbetegedés, amelyben a nyelvi kifejezési funkciók szelektív fejlődési zavara, késése mutatható ki. Ezekre a gyermekekre jellemző, hogy intellektuális funkcióik megtartottak, és hogy non-verbális intelligenciájuk általában jobbnak bizonyul, mint a verbális. A kórkép etiológiája, patomechanizmusa nem ismert. Kialakulásában a KIR-re ható genetikai és epigenetikai hatásokat feltételeznek. Mivel az expresszív nyelvi zavarok az AK korai jelei közé tartoznak és a betegség kialakulásának jó prediktorai (Snowdon és mtsai 1996), másrészt az expresszív nyelvi zavarok háttérben idegrendszeri fejlődési, érési és genetikai tényezőket feltételeznek, ezért apoE allél polimorfizmus vizsgálatunkat ilyen betegcsoportra is kiterjesztettük (*Csapó és mtsai 1999*). Eredményeinket a 13-14. táblázatok foglalják össze.

42 fő expresszív beszédfejlődési zavart mutató és 40 fő KT gyermek apoE polimorfizmusát megvizsgálva, az egyes allélok gyakoriságát illetően nem találtunk különbségeket a csoportok között. Az expresszív fejlődési zavart mutató gyerekek klinikai jellemzőit az apoE allélok szerint csoportosítva szintén nem találtunk szignifikáns különbségeket (14. táblázat). Tendencia-szerű eltérések mutatkoztak azonban arra vonatkozóan, hogy az E4 allél öröklése fokozza a hajlamot a nyelvi fejlődés késésére (ld. első szavak és mondatok megjelenése). Az E4 allélt hordozó expresszív fejlődési zavarral rendelkező gyerekek alacsonyabb pontszámot értek el továbbá a vizuoperceptív és általános intelligencia tesztekben, mint a non-verbális képességekben (Raven teszt).

13. táblázat ApoE genotípusok és allél frekvenciák a kontroll és expresszív beszédfejlődési zavarban szenvedő gyermekeknél.

apoE genotípus	Kontroll (40 fő)	Expresszív beszédfejlődési zavar (43 fő)
2/2	-	-
2/3	6	5
3/3	25	27
3/4	9	10
4/4	-	-
2/4	-	-
apoE allél	%	%
E2	8%	6%
E3	81%	82%
E4	11%	12%

14. táblázat Az expresszív beszédfejlődési zavarban szenvedő gyermekek klinikai sajátosságai apoE alléltípusuk függvényében.

	Expresszív beszédfejlődési zavar		
	E2 (2 fő)	E3 (27 fő)	E4 (10 fő)
EEG eltérések (fő)	1	5	4
Első szavak(év)	1.5±0.6	2.0±0.5	2.4±0.5
Első mondatok(é)	1.9±0.3	2.3±0.6	2.3±0.7
DTVP(PcQ)=Frostig Diagnosztikai Teszt	80.0±2.8	74.1±8.6	92.9±8.4
Bp-i Binet Teszt (IQ)	96.8±10.8	93.6±8.4	92.9±8.4
Raven Teszt (IQ)	103.5±8.7	104.7±13.0	107.6±11.7
DPT (%)	45.9±20.3	47.1±14.9	50.1±13.9

DTVP= Developmental Test of Visual Perception (=Frostig Diagnosztikai Test)

DPT=Dislexia Prognosztikai Teszt

Összefoglalva, az irodalomban elsőként számoltunk be arról, hogy az AK-hoz hasonlóan, szubkortikális VD-ban az E4-es allél szignifikánsan gyakrabban fordul elő, mint a KT személyeknél a magyar populációban (Kálmán és mtsai 1998). Eredményeink szerint nem valószínűsíthető kapcsolat az E4-allél öröklése és a gyermekkori expresszív fejlődési zavar között (Csapo és mtsai 1999).

3.8. Az apoE gén E4-es alléljának öröklése befolyásolja-e AK-os betegek szelegilin kezelésének kognitív változóit?

Az apoE gén E4-es alléljának öröklése a kognitív teljesítménnyel is kapcsolatba hozható mind a demens betegek, mind nem demens személyek funkciói esetében (Bretsky és mtsai 2003; Palotás és Kálmán 2006). Az izoforma dependens hatás a memória funkciók közül elsősorban az epizodikus memóriával kapcsolatosan érvényesül (Bretsky és mtsai 2003), és hasonló eltéréseket mutattak ki apoE transzgenikus egerek esetében is (Raber és mtsai 2000). Az E4 allél kognitív funkciókat moduláló hatása nem demens személyeknél felidézési feladatokban bizonyított (Small és mtsai 2000). A nem demens E4 allél hordozók gyorsabb memória romlását nyomonkövetéses vizsgálatok igazolták (Caselli és mtsai 2004), és ez a deficit csökkent agyi glükózfelhasználással is jár (Small és mtsai 2000).

Számos bizonyíték van arra vonatkozóan, hogy nem csak az AK kezdetének idejét és progressziójának mértékét, hanem az AK-os betegek farmakoterápiákra adott válaszkészségét is módosíthatja apoE genotípusuk (Kálmán és Janka 1996a; Kálmán és Janka 2005a). Az AChE gátló gyógyszerek első képviselője, a takrin esetében mutattak ki például ilyen hatást (Poirier és mtsai 1995; Rigaud és mtsai 2000). Más, hasonló hatású molekulák, mint pl. a metrifonát és a galantamin alkalmazásakor azonban nem volt igazolható ilyen összefüggés (Farlow és mtsai 1999; Raskind és mtsai 2000). A magyar fejlesztésű szelegilin (L-deprenil) esetében pedig nem rendelkezünk ilyen jellegű adatokkal, holott ezt a monoamino oxidáz gátló vegyületet sikeresen próbálták ki és alkalmazzák az AK kezelésében (Sano és mtsai 1997).

Az apoE gén polimorfizmusa és az AK összefüggéseit vizsgáló kísérleteink következő részében ezért egy 48 hetes placebo kontrollált multicentrikus vizsgálat részeként az E4-es allél hordozása, és az AK betegek szelegilin kezelésre adott terápiás válaszána összefüggéseit vizsgáltuk elsőként az irodalomban (Kálmán és mtsai 2003).

15. táblázat A szelegilin kezelt Alzheimer-kóros betegek demográfiai jellemzői az apoE E4-es allélt hordozó és nem hordozó személyeknél.

	apoE4 allélt nem hordozók (n=26)	apoE4 allélt hordozók (n=17)
Átlagéletkor \pm SD	70 \pm 8.3	70 \pm 8.2
Férfi/nő (fő)	5/21	6/11
Iskolázottság: (fő)		
- Általános	10 (38%)	6 (35%)
- Középiskola vagy magasabb végzettség	16 (62%)	11 (65%)

Az apoE E4-es allélt hordozó és nem hordozó AK alcsoportok semmilyen demográfiai változó tekintetében nem tértek el egymástól (15. táblázat). A E4-es allélt hordozó AK-os betegek arányát (25%) (16. táblázat) hasonlóan találtuk, mint a korábbi vizsgálatainkban (28%), egy másik magyar populáción (Kálmán és mtsai 1997).

A szelegilin vizsgálat elsődleges és másodlagos kimeneteli változóinak kezelés előtti és utáni pontértékeit vizsgálva (17. táblázat) nem találtunk különbségeket az E4-es allélt hordozó és nem hordozó AK betegcsoportok között. Az E4-es allélt hordozók azonban, ha nem is szignifikánsan, de rosszabbul teljesítettek mind az ADAS-COG/11, mind a CGIc és CGIc skálákon.

16. táblázat A szelegilin kezelt Alzheimer-kóros betegek apoE genotípus és allél frekvencia gyakoriságai.

apoE genotípus	2/2	2/3	3/3	3/4	4/4
	1 (2%)	2 (5%)	23 (53%)	12 (28%)	5 (12%)
apoE allél	E2		E3		E4
	4 (5%)		60 (70%)		22 (25%)

17. táblázat A vizsgált klinikai változók eltérései 48 hetes szelegilin kezelést követően az apolipoprotein E4-es allélt hordozó és nem hordozó Alzheimer-kóros személyeknél.

	apoE4 allélt nem hordozók (n=26)		apoE4 hordozók (n=17)		
Kimeneteli változó	Átlag	SD	Átlag	SD	p érték
ADAS	-3.0	13.80	-5.6	12.67	0.576
ADAS-Cog/11	2.9	10.66	4.8	8.68	0.441
MMSE	1.3	5.59	3.3	3.60	0.213
CGIc	0.2	1.11	-0.2	0.97	0.197
CGIs	-0.1	0.97	-0.4	1.33	0.205

Mann-Whitney U teszt

Eredményeink szerint, a szelegilin kezelés hatékonyságát nem befolyásolta az AK betegek apoE allél státusza. Vizsgálataink hasonló eredményre vezettek, mint az AChE gátlókkal végzett összehasonlító elemzések jelentős része (Farlow. és mtsai 1999; Raskind és mtsai 2000), azaz az AK személyek terápiás válaszát nem befolyásolja apoE státuszuk.

A szelegilinről tudjuk, hogy csökkenti a szabadgyök termelést (Wu és mtsai 1996) és oxidatív stressz esetén neuroprotektív hatású (De La Cruz és mtsai 1996). Az apoE molekula E4-es izoformája pedig kevésbé véd a szabad gyökök károsító hatása ellen, mint a többi izoformák (Miyata és Smith 1996; Zana és mtsai 2006). Ezek alapján azt vártuk volna, hogy a E4-es allélt hordozó AK betegek jobban reagálnak a szelegilin kezelésre, mint az E2 és E3 allélt hordozók.

Vizsgálatunk negatív eredménye ellenére is nemzetközi tudományos értékű, hiszen ez az első ilyen jellegű adat a szelegilin terápiával kapcsolatban. Negatív eredményeink oka lehet a relatíve kicsi esetszám, a rövid kezelési idő, és a kimeneteli változók természete. Egy évnél hosszabb klinikai vizsgálatok is ismertek az AK betegek szelegilin kezelésével kapcsolatban (Sano és mtsai 1997; Filip és Kolibas 1999), bár eredményeik szerint a hosszabb kezelés sem hozott nagyobb mértékű javulást a kognitív tünetek esetében. Eredményeink, és más AChE gátló molekulákkal végzett hasonló vizsgálatok negatív eredményei nem zárják ki annak a lehetőségét, hogy a szelegilin molekuláris hatásaival összefüggő más kimeneteli változók választása pl. a vér oxidatív paraméterei, neurotranszmitter anyagcsere, amiloid lerakódás mértéke stb. tekintetében nem találtunk volna E4-es allél függő terápiás válaszkészséget.

Összefoglalva, vizsgálatunk eredményei azt a nézetet támasztják alá, hogy annak ellenére, hogy az AK és egészséges kontroll személyek kognitív mnesztikus teljesítményét befolyásolja apoE genotípusuk, a jelenlegi AK farmakoterápiák közül a szelegilin hatását nem modulálja az apoE genotípus ezekre a tünetekre (Kálmán és mtsai 2003).

3.9. Befolyásolja-e Az apoE gén E4-es alléljának öröklése AK-os betegek kinurenin metabolizmusát a vérben?

Az AK etiológiai hipotézisei között excitotoxikus elméletet is ismerünk, amely az oxidatív stressz és a sejthalál hipotézisekhez kapcsolódik legjobban (Lipton és Rosenberg 1994; Ramassamy és mtsai 1999). Az AK glutamát hipotézise szerint az excitátoros rendszer fokozott működése neuronális károsodást, sejthalált okoz a sejten belüli kalcium ion szintek emelése és szabadgyök károsodás révén (Lipton és Rosenberg 1994). A posztzinaptikus glutamát receptorok működése az LTP, és így az AK klinikuma szempontjából is rendkívül fontos, hiszen ez a jelenség a tanulási és emlékezési folyamatok szabályozásában is szerepet játszik (Shimizu és mtsai 2000).

Az excitátoros és gátló neurotranszmisszió szabályozásában a koleszterinnek fontos reguláló szerepét mutatták ki (Sooksawate és Simmonds 2001). Annak ellenére, hogy az apoE a koleszterin metabolizmus fontos regulátora, allél specifikus hatását nem vizsgálták a kinurenin anyagcsere vonatkozásában.

A KINA az ionotróf glutamát, és az $\alpha 7$ nikotin receptorok endogén antagonistája (Gramsbergen és mtsai 1997). Ez a neuroprotektív hatású molekula a KAT I és KAT II enzimek révén szintetizálódik a KIN-ből (Guidetti és mtsai 1997). AK-ban a kinurenin metabolizmus többfajta zavarát ismerjük (Baran és mtsai 1999; Widner és mtsai 2000). AK-ban a likvor KINA tartalma csökkent (Heyes és mtsai 1992), ugyanakkor a striátumban emelkedett szintjeit mutatták ki kompenzátoros mechanizmusokat feltételezve (Baran és mtsai 1999). A vérben

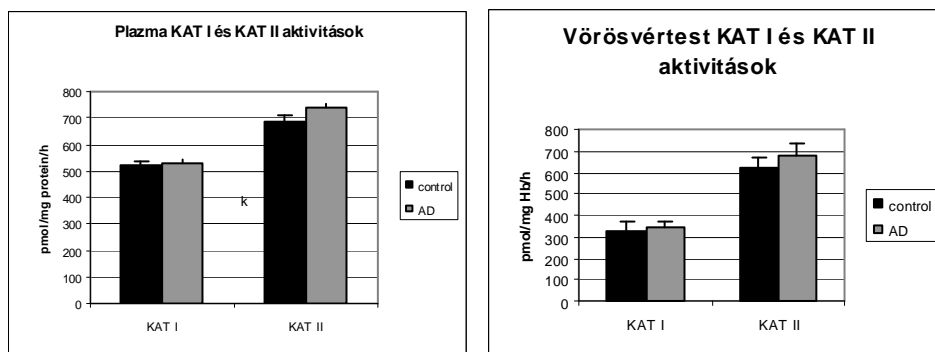
emelkedett TRP/KIN hányadosról számoltak be AK betegek esetében (Widner és mtsai 2000).

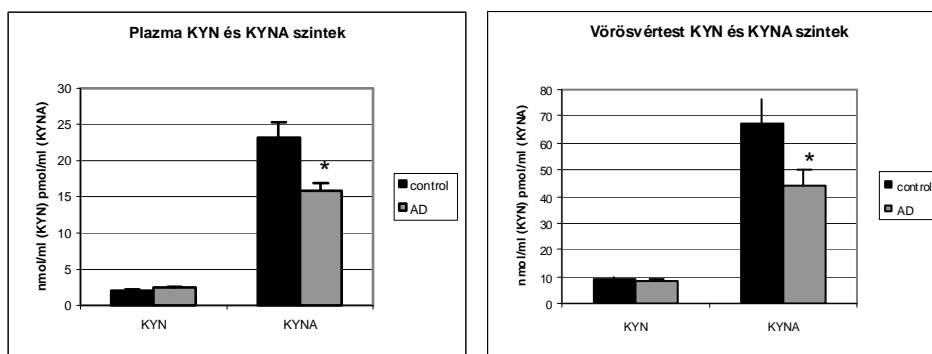
A neuroprotektív metabolikus út mellett a kinurenin anyagcsere másik lehetséges vonalán keletkező termékekről (pl. 3HK) pedig bebizonyították, hogy oxidatív stresszt okoznak és apoptózist indukálnak (Okuda és mtsai 1998). A QUIN-ről a közelmúltban igazolták, hogy oxidatív stressz indukáló hatása révén neurotoxikus (Guillemin és Brew 2002). Mivel az apoE molekuláról ismert, hogy izoforma specifikusan neuroprotektív és antioxidáns hatású (Mahley és mtsai 2006a,b), ezért vizsgálataink következő szakaszában a perifériás (vér) kinurenin metabolizmusának egyes eltéréseit vizsgáltuk meg AK-os betegek plazmájában és vvt-ben az apoE polimorfizmussal összefüggésben (Hartai és mtsai 2006). Eredményeinket a 18. táblázat és a 11. ábra foglalja össze.

18. táblázat ApoE allél frekvenciák a kontroll és Alzheimer kóros betegek csoportjában.

apoE allél	Kontroll személyek (n= 29)	Alzheimer-kór (n=26)
E2	6 (10.3%)	2 (4%)
E3	45 (77.6%)	37 (72.5%)
E4	7 (12.1%)	12 (23.5%)

Korábbi megfigyeléseinkhez hasonlóan (Kálmán és mtsai 1996a,b, 1997; McConathy és mtsai 1997; Kálmán és mtsai 2003; Juhász és mtsai 2003a,b), és azt ismételten megerősítve az E4 allél közel 24%-os gyakorisággal fordult elő az AK betegek esetében (18. táblázat). A vizsgált kinurenin metabolitok és enzimek közül egyedül a KINA szintek szignifikáns csökkenése volt kimutatható mind a vérplazmában, mind a vvt-ben (11 ábra). A kinurenin metabolizmus általunk vizsgált tényezői nem mutattak összefüggést a vizsgált személyek és csoportok életkorával, nemével és az E4 allél öröklésével.





11. ábra Plazma és vörösvértest KAT I és KAT II aktivitások, KYN és KYNA szintek.

A KIR-i és perifériás kinurenin metabolizmus összefüggéseinek és markereinek vizsgálata nem csak az AK, hanem más neurodegeneratív betegségek szempontjából is nagy jelentőségű, de ennek ellenére igen kevés az ide vonatkozó adat. Méréseink az irodalomban elsőként mutatták be a neuroprotektív hatású KINA mennyiségének csökkenését az AK betegek vérplazmájában és vvt-iben (Hartai és mtsai 2006). Ezidáig más perifériás AK vonatkozású KINA adattal nem rendelkezünk. A kinurenin metabolizmus prekursorának, a triptofánnak szintjeit azonban több tanulmányban is alacsonynak találták az AK-os betegek vérében és likvorában (Tohgi és mtsai 1995; Widner és mtsai 2000). Heyes és mtsai (1992) AK betegek likvorában találtak szintén csökkent KINA értékeket. Az AK-os betegek agyából egyetlen mérés ismert, és az sem specifikusan AK érintettségű területről, a striátumból származik. Itt emelkedett KINA szinteket találtak (Baran és mtsai 1999). Ezt a változást kompenzátoros jellegűnek tartják, mivel a QUIN szintek emelkedése mutatható ki neuronális gyulladásos, és sejthalállal kapcsolatos folyamatokban is (Smythe és mtsai 2003).

Mivel az AK-os betegek vérében a KAT I és KAT II enzimek aktivitásában nem találtunk eltéréseket, feltételezhető, hogy nem a KINA termelés zavara, hanem inkább metabolizmusának más eltérései lehetnek felelősek az általunk megfigyelt csökkent plazma, és vvt KINA szintekért. Ennek a kérdésnek a megválaszolásához azonban további vizsgálatok szükségesek.

A vvt-k esetében sem rendelkezünk semmilyen korábbi adattal a neuroprotektív KINA metabolikus út tekintetében. Másik fő megfigyelésünket, a vvt-k csökkent KINA szintjeit a sejtek energia termelésének károsodása is okozhatja AK-ban (Serra és mtsai 1994; Rossi és mtsai 2002; Vina és mtsai 2004; Zana és mtsai 2006), amely visszavezethető a BAP okozta specifikus peroxidatív és metabolikus károsodásukra (Mattson 2002).

Eredményeinket összefoglalva a neuroprotektív KINA csökkent szintjeit mutattuk ki elsőként az irodalomban az AK-os betegek vérében és vvt-iben (Hartai és mtsai 2006). A KINA szintek perifériás eltérései a kinurenin metabolizmus zavarát igazolják AK-ban, amely független a betegek apoE státuszától.

3.10. Hogyan befolyásolja apoE gén promoter régiójának -491A/T polimorfizmusa az AK rizikóját? Kimutatható-e interakció az apoE gén E4-es alléljának öröklése és a gén promoter régiójának polimorfizmusa között?

Abból a posztulátumból kiindulva, hogy az AK genetikailag is egy heterogén betegség, az apoE polimorfizmusának felismerése után számos más gén allél variációit vizsgálták meg mint lehetséges AK rizikó faktort (*Palotás és Kálmán 2006*).

Az apoE promoter régiójának több polimorfizmusa is ismert, mint pl. a 219G/T, -427T/C és a 491A/T (Taylor és mtsai 1987; Artiga és mtsai 1998). Ez utóbbi, a 491A/T polimorfizmus esetében, az A allél homozigóták a legkevesebb, a TT homozigóták pedig a legtöbb apoE-t expresszálnak a gén dózisától függően, és ez a jelenség a vizsgálati személyek fenotípusában, vérében is nyomon követhető apoE szint változásokat okoz (Roks és mtsai 2002; *Palotás és Kálmán 2006*). Az A allél előfordulását elsőként Bullido és mtsai (1998) találták összefüggésben a sporadikus AK-ral, az apoE polimorfizmustól függetlenül.

Mivel mind az apoE, mind promoterének 491A/T polimorfizmusa nagyfokú etnikai variabilitást mutat (Schmitt és Estus 2004), vizsgálataink következő szakaszában az A allél gyakoriságát vizsgáltuk meg a magyar AK és idős KT populációkban (*Juhász és mtsai 2005a*). Eredményeinket a 19-21. táblázatok foglalják össze.

19. táblázat ApoE genotípus és allél frekvenciák az Alzheimer-kóros és kontroll csoportokban.

apoE genotípus*	Kontroll (n = 53)	Alzheimer-kór (n = 52)
2/2	–	–
2/3	6 (12%)	3 (6%)
2/4	–	–
3/3	41 (77%)	31 (61%)
3/4	5 (9%)	15 (28%)
4/4	1 (2%)	3 (6%)
apoE allél**		
2	6 (6%)	3 (3%)
3	93 (87%)	80 (77%) [#]
4	7 (7%)	21 (20%) ^{###}

*Kontroll vs. Alzheimer-kór $p < 0.039$, Pearson χ^2 test

** Kontroll vs. Alzheimer-kór $p < 0.011$

[#] Kontroll vs. Alzheimer-kór $p < 0.047$, Fisher's exact test, OR=2.140; 95% CI (1.02, 4.48)

^{###} Kontroll vs. Alzheimer-kór $p < 0.004$, Fisher's exact test, OR=3.578; 95% CI (1.449, 8.834)

20. táblázat ApoE promoter -491A/T genotípusok és allél frekvenciák az Alzheimer-kóros és kontroll csoportokban.

	Kontroll (n = 53)		Alzheimer-kór (n = 52)	
	n (%)	(95% CI)	n (%)	(95% CI)
apoE promoter genotípus*				
A/A	31 (58%)	(45.1-70.7)	25 (48%)	(35.1-61.3)
A/T	20 (38%)	(25.9-51.2)	23 (44%)	(31.6-57.7)
T/T	2 (4%)	(1.0-12.7)	4 (8%)	(3.0-18.2)
apoE promoter allél**				
A	82 (77%)	(68.5-84.3)	73 (70%)	(60.8-78.1)
T	24 (23%)	(15.7-31.5)	31 (30%)	(21.9-39.2)

A 95%-os konfidencia intervallumok (CI) a Wilson képlet szerint.

* Kontroll vs. Alzheimer-kór $\chi^2 = 1.509$, d.f. = 2, $P = 0.47$, egzakt $P = 0.477$

** Kontroll vs. Alzheimer-kór $P = 0.273$; Fisher teszt OR = 0.689; 95% CI (0.371, 1.28)

Jelen vizsgálatunkban is szignifikánsan emelkedett E4 allél gyakoriságot (20%) találtunk a magyar AK betegeknél (19. táblázat). Az apoE -491A/T polimorfizmus esetében azonban nem volt különbség a beteg és kontroll populációk között, és az A allél öröklése nem emelte meg szignifikánsan az AK rizikóját ($p=0.237$; OR=0.689; 95% CI: 0.371, 1.28). A -491AA genotípus azonban szignifikánsan gyakoribbnak bizonyult (23% AK és 6% KT) az E4 allélt hordozó AK betegeknél (21. táblázat).

21. táblázat ApoE promoter -491A/A genotípus gyakorisági megoszlása az apoE4 allélt hordozó és nem hordozó Alzheimer-kóros és kontroll személyeknél (odds hányadosok és 95%-os konfidencia intervallumok).

	Kontroll		Alzheimer-kór		OR (95% CI)	p	OR (95% CI)*	p*
Életkor		%		%			1.043 (0.99 – 1.10)	0.131
Nem (férfi)	23	43.4	16	30.7			0.510 (0.20, 1.27)	0.149
apoE4 +, A/A+	3	5.7	12	23.1	referencia		Referencia	
apoE4 -, A/A+	28	52.8	13	25.0	8.615 (2.07-35.86)	0.003	8.963 (2.10 – 8.35)	0.003
apoE4 +, A/A-	3	5.7	6	11.5	2.0 (0.31-13.06)	0.469	2.221 (0.33 – 5.06)	0.414
apoE4 -, A/A-	19	35.8	21	40.4	3.619 (0.88-14.81)	0.074	4.156 (0.98 – 17.61)	0.053
	53		52	100.0				

*Logisztikus regresszió a nemre és az életkorra vonatkozóan.

Az irodalomban elsőként vizsgáltuk az apoE promoterének -491A/T polimorfizmusát AK-os betegek esetében a magyar populációban. Eredményeink szerint az apoE promoter polimorfizmus önmagában nem tekinthető rizikónak az AK vonatkozásában, hasonlóan más európai (holland, spanyol és francia) (Zurutuza és mtsai 2000; Alvarez-Arcaya és mtsai 2001; Roks és mtsai 2002), továbbá amerikai és ázsiai etnikumokhoz (Perry és mtsai 2001; Thome és mtsai 1999; Chen és mtsai 1999).

A finn és a magyar etnikumot ugyanabba a csoportba sorolják a normál populációk apoE

alléljainak megoszlását illetően (Hallman és mtsai 1991). Eredményeink arra utalnak, hogy ez a hasonlósági megfigyelés igaz az apoE promoter -491A/T polimorfizmusára is, hiszen a finnekénél sem találtak AK specifikus -491A/T apoE promoter polimorfizmus rizikót (Helisalmi és mtsai 1999). Továbbá, a magyar népcsoport esetében az AA genotípus gyakoriságot még alacsonyabbnak találtuk, mint a finnek esetében, mind az AK (49% vs. 87%), mind a KT (58% vs. 71%) populációkban (az említési sorrendnek megfelelően).

Összefoglalva, a nemzetközi irodalomban elsőként számoltunk be a magyar KT és AK populáció apoE promoter gén -491A/T polimorfizmusának gyakorisági megoszlásáról (Juhász és mtsai 2005a). Eredményeink szerint ez az SNP nem jelent önálló rizikót az AK szempontjából, de az A allél közös előfordulása az apoE gén E4-es alléljával kapcsolt és emelkedett AK rizikót hordoz.

3.11. Rizikónak minősül-e a CYP46A1 enzim génjének T/C polimorfizmusa a magyarországi AK-os betegek esetében? Kimutatható-e interakció az apoE gén E4-es allélja és a 24(S)hidroxiláz gén C-allélja között?

Ahogy az általános bevezető rész koleszterin metabolizmust tárgyaló fejezetében is említettem, az agy különleges helyzetben van koleszterin metabolizmusa szempontjából, hiszen saját magát látja el transzport hiányában, *de novo* szintézisével (Kálmán és Janka 2005a), a molekula eltávolítása azonban már a vér-agy gáton keresztül, vízdékony formában történik (Bjorkhem és mtsai 1997). A vízdékony 24(S)hidroxiszterol szintézisét a KIR specifikus 24-hidroxiláz enzim (CYP46A1) végzi (Bjorkhem és mtsai 1998). Az agyból a vérkeringésbe jutó 24(S)hidroxiszterol pedig a máj X-receptorain keresztül szabályozza a lipid metabolizmusért felelős gének expresszióját (Bretillon és mtsai 2000).

Az AK-ban kimutatható csökkent agyi CYP46A1 aktivitás a membránok koleszterin tartalmának emelkedéséhez, és az APP-nek a koleszterin gazdag lipid raftokban történő áthelyeződéséhez vezet. Így a feltételek inkább az APP amiloidogén metabolikus útjának kedveznek, amely következményes BAP felhalmozódáshoz vezethet (Simons és mtsai 2001; Wolozin 2003). Az AK-ban megfigyelt csökkent CYP46A1 aktivitást az enzim 2-es intronjának T/C polimorfizmusa is magyarázhatja, mivel a C-allélt öröklők esetében az enzim kisebb aktivitással működik (Wolozin 2003). Ennek megfelelően a C-allélt hordozó AK betegek agyában több amiloidot mutattak ki, és likvor BAP/tau hányadosuk is csökkent (Papassotiropoulos és mtsai 2002; Palotás és Kálmán 2006).

Az AK-os betegek koleszterin metabolizmusával foglalkozó vizsgálataink következő szakaszában ezért a magyar AK-os betegek CYP46A1 gén 2-es intronjának T/C polimorfizmusát vizsgáltuk meg az AK rizikója szempontjából (Juhász és mtsai 2005b). Arra a kérdésre is választ szerettünk volna kapni, hogy van-e interakció az apoE gén E4 allélja és a

24(S)hidroxiláz génjének C-allélja között?

22. táblázat ApoE genotípusok és allél frekvenciák Alzheimer demenciában és idős kontroll személyek esetében.

*apoE genotípus	Kontroll (n = 102)	Alzheimer-kór (n = 125)
2/2	-	1 (0.8% {0.004-5.0})
2/3	14 (13.7% {7.9-22.3})	10 (8% {4.1-14.6})
2/4	-	1 (0.8% {0.004-5.0})
3/3	69 (67.6% {57.5-76.4})	66 (52.8% {43.7-61.7})
3/4	15 (14.7% {8.73-23.4})	37 (29.6% {21.9-38.5})
4/4	4 (3.9% {1.26-10.3})	10 (8% {4.1-14.6})
Allél**		
2	14 (6.9% {3.9-11.5})	13 (5.2% {2.9-8.9})
3	167 (81.9% {75.7-86.6})	179 (71.6% {65.5-77.0})
4	23 (11.3% {7.4-16.6})	58 (23.2% {18.2-29.0})

A zárójelben levő adatok %-os gyakoriságot és konfidencia intervallumokat jelentenek (% {95% CI Wilson képlet szerint}).

* Kontroll vs. Alzheimer-kór, Pearson $\chi^2=12.409$, $df=5$, $p = 0.03$, egzakt teszt $p=0.015$

** Kontroll vs. Alzheimer-kór, Pearson $\chi^2=11.029$, $df=2$, $p = 0.004$

23. táblázat CYP46A1 genotípusok és allél frekvenciák Alzheimer demenciában és idős kontroll személyek esetében.

*CYP46A1 T/C genotípus	Kontroll (n = 102)	Alzheimer-kór (n = 125)
T/T	50 (49% {39.5-58.6})	54 (43.2% {34.8-51.9})
T/C	49 (48% {38.5-57.6})	66 (52.8% {44.1-61.3})
C/C	3 (3% {1.0-8.2})	5 (4% {1.7-9.0})
Allél**		
T	149 (73% {65.5-78.6})	174 (70% {63.6-74.9})
C	55 (27% {21.3-33.4})	76 (30% {25.0-36.3})

A zárójelben levő adatok %-os gyakoriságot és konfidencia intervallumokat jelentenek (% {95% CI Wilson képlet szerint}).

* Kontroll vs. Alzheimer-kór, Pearson $\chi^2=0.845$, $df=2$, $p = 0.655$, egzakt teszt $p = 0.712$

** Kontroll vs. Alzheimer-kór, Pearson $\chi^2=0.647$, $df=1$, $p = 0.421$, exakt teszt $p = 0.466$, OR=0.845; 95% CI (0.561, 1.274)

24. táblázat. A CYP46 gén C-alléljának és az apoE gén E4-es alléljának interakciója Alzheimer demenciában és idős kontroll személyek esetében.

apoE E4 allél	CYP46 C allél	Kontroll n (%)	Alzheimer-kór n (%)	OR (95% CI)	p
-	-	40 (39.2)	28 (22.4)	referencia	
-	+	43 (42.2)	49 (39.2)	1.628 (0.864-3.066)	0.131
+	-	10 (9.8)	26 (20.8)	3.714 (1.549-8.908)	0.003
+	+	9 (8.8)	22 (17.6)	3.492 (1.401-8.707)	0.007

OR odds hányadosok és CI, konfidencia intervallumok

$\chi^2=13.176$, $df=3$, $p=0.004$

Eredményeinket a 22-24. táblázatok foglalják össze. Elsőként számoltunk be a CYP46A1 gén 2-es intron T/C polimorfizmusának gyakorisági megoszlásáról a magyar AK és KT populációk esetében. A C-allél 27%-os gyakorisággal fordult elő a KT személyeknél (23. táblázat). Ez az előfordulási gyakoriság hasonlóan bizonyult más európai, kaukázusi populációk megfelelő értékeihez (spanyolok 21%; franciák 30%) (Combarros és mtsai 2004; Kabbara és mtsai 2004). A német (51%) és kaukázusi amerikai (37%) etnikumok esetében a magyarnál magasabb értékeket találtak azonban (Kolsch és mtsai 2002; Desai és mtsai 2002). Vizsgálatunk adatai szerint a magyar AK-os betegeknek a 24(S)hidroxiláz gén C-alléljának öröklése nem minősül demencia rizikónak, akár önmagában vizsgálva, akár az apoE gén E4 alléljával közösen (23-24. táblázatok). Eredményeink megerősítik más etnikumokon végzett hasonló vizsgálatok negatív kimenetelű következtetéseit (Desai és mtsai 2002; Chalmers és mtsai 2004; Ingelsson és mtsai 2004; Kabarra és mtsai 2004). Hasonlóan más AK-val kapcsolatos potenciális rizikó polimorfizmus vizsgálatokhoz, a CYP46A1 gén 2-es intronjának T/C allél polimorfizmusa esetében is ellentmondóak az adatok, hiszen több pozitív eredményt is közöltek (Kolsch és mtsai 2002; Borroni és mtsai 2004; Johansson és mtsai 2004; Wang és mtsai 2004). A különbségeket ebben az esetben is etnikai és metodológiai (betegbeválasztás kritériumai, pontossága, a klinikai diagnózis neuropatológiai megerősítése) eltérések okozhatják. A negatív eredményű vizsgálatok pontossága mellett szól, hogy ezek közül kettő esetében neuropatológia is megerősítette az AK diagnózist (Chalmers és mtsai 2004; Ingelsson és mtsai 2004), további kettő pedig igen nagy létszámú betegcsoportot vizsgált (Desai és mtsai 2002; Kabbara és mtsai 2004).

Elsőként számoltunk be az irodalomban a CYP46A1 gén 2-es intron T/C alléljainak előfordulási gyakoriságairól a magyar KT és AK populációkban (Juhász és mtsai 2005). Eredményeink szerint a C-allél öröklése sem önmagában, sem az apoE E4-alléllal közösen nem változtatja meg az AK rizikóját.

3.12. Hogyan változik az AChE enzim aktivitása AK-os betegek vérésejtjeiben? Az AChE milyen molekuláris formái fordulnak elő a vérésejtben? Vannak-e AK specifikus eltérések arányaikban? A BChE génjének K-allélja milyen gyakori a magyar AK-os betegek esetében? A BChE-K variáns génjének hordozása milyen kapcsolatban van az apoE gén E4-es alléljának öröklésével?

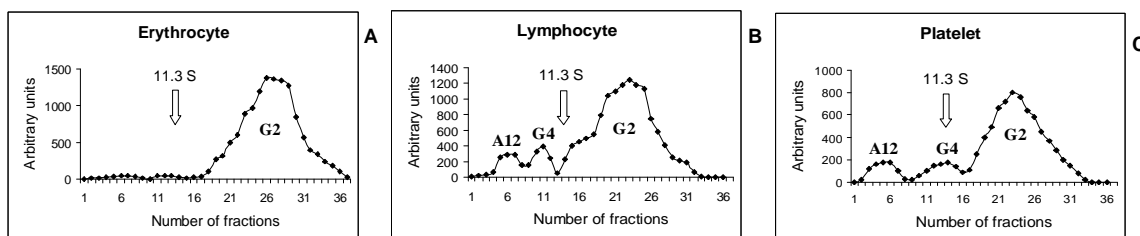
Az AK kolinerg hipotézise szerint a bazális előagyi kolinerg neuronok többfajta okra visszavezethető elégtelen működése és pusztulása az elsődleges felelős a demencia szindróma kognitív tüneteinek kialakulásáért. Az acetilkolin szinaptikus lebontását két enzim végzi, az AChE (EC 2.3.1.6), melyek aktivitása csökken a bazális előagy kortikális projekcióinak területén AK-ban, és a BChE (EC 3.1.1.7), melynek aktivitása inkább fokozódik a betegség progressziója során. A Meynert-mag kolinerg neuronjainak akár 80%-a is elpusztulhat az AK

súlyos stádiumaiban (Geula és Mesulam 1989). AK-ban nemcsak az enzimek aktivitása, hanem sejten belüli lokalizációjuk is megváltozik, axonális elhelyezkedésből inkább citoplazmatikussá válik (Wright és mtsai 1993), továbbá a SzP-ok és NFF-ok komponenseiként is megjelennek (Mesulam és mtsai 1987).

A kolinészterázok nem csak a KIR-ben, hanem a perifériás szövetekben, így a vérben is jelen vannak, lokalizációjuknak megfelelően eltérő molekuláris formákban. A globuláris alakok (G1, G2 és G4) főleg a KIR-ben, az aszimmetrikus, kollagén farokkal rendelkező formák (A4, A8 és A12) pedig a perifériás idegrendszerben, izmokban, vérben fordulnak elő. Perifériás, AK specifikus marker funkcióik azonban nem bizonyítottak (Sayer és mtsai 2004).

További vizsgálataink egyik célja ezért a vvt-k, limfociták és trombociták AChE aktivitásának és molekuláris formáinak meghatározása volt AK és KT személyek vérében (Rakonczay és mtsai 2005).

Mivel a BChE enzim génjének K allélja és az AK között több tanulmány mutatott ki kapcsolatot (Lehmann és mtsai 1997; Wiebusch és mtsai 1999; Raygani és mtsai 2004), ezért vizsgálataink második célja a BChE-K allél és az AK közötti kapcsolat vizsgálata volt a magyar AK és KT populációkban. Arra a kérdésre is választ szerettünk volna kapni továbbá, hogy milyen a két SNP (BChE-K allél és apoE gén E4-es allél) interakciója az általunk vizsgált AK populációban?



12. ábra Az AChE enzim molekuláris formái a kontroll személyek vörösvértestjeiben, limfocitáiban és trombocitáiban.

A kolinerg rendszer eltéréseivel kapcsolatosan nagyon kevés perifériás, azaz nem KIR-i adat áll rendelkezésre. Appleyard és mtsai (1991) csökkent AChE aktivitást mutatott ki AK betegek mellékveséjében. Inestrosa és mtsai (1994) a betegek limfocitáiban talált csökkent aktivitást, Sayer és mtsai (2004) pedig a betegek nyálában talált hasonló irányú változást. Eredményeink ellentmondanak a korábbi megfigyeléseknek, hiszen az AK betegek véréből tisztított vvt-k, trombociták és limfociták AChE enzim aktivitása nem tér el a KT személyekétől. Az eltérő eredményeket metodikai (poszt mortem vizsgálat, nyálminta) és beteg beválasztási különbségek magyarázhatják.

25. táblázat Az AChE molekuláris formáinak szedimentációs koefficiense (átlag \pm SEM) az Alzheimer-kóros és kontroll személyek vörösvértestjeiben (V), limfocitáiban (L) és trombocitáiban (T).

Kontroll				Alzheimer-kór		
G2 [S]		G4 [S]	A12 [S]	G2 [S]	G4 [S]	A12 [S]
V	6.2±0.5 (n=3)	12.8±0.1 (n=3)	15.5±0.4 (n=3)	5.8±0.4 (n=5)	12.3±0.4 (n=5)	15.3±0.6 (n=5)
T	6.2±0.4 (n=13)	12.9±0.7 (n=13)	16.0±0.8 (n=13)	5.8±0.5 (n=12)	11.9±1.1 (n=12)	15.9±1.4 (n=12)
L	6.2±0.5 (n=12)	12.2±1.3 (n=12)	15.6±1.4 (n=12)	6.0±0.5 (n=18)	11.8±0.98 (n=18)	15.6±1.3 (n=18)

A molekuláris formákat vizsgálva a G2 forma fordult elő legnagyobb mennyiségben (80%) minden általunk vizsgált sejtfeleségben (12. ábra és 26. táblázat), az agyban többnyire előforduló G1 forma pedig nem volt kimutatható egyik sejt típusban sem.

26. táblázat Az AChE molekuláris formáinak (G2, G4, A12) százalékos megoszlása az Alzheimer-kóros és kontroll személyek vörösvértestjeiben, limfocitáiban és trombocitáiban.

Kontroll				Alzheimer-kór		
G2%		G4%	A12%	G2%	G4%	A12%
V	98.6±0.5 (n=3)	0.63±0.3 (n=3)	0.76±0.24 (n=3)	99.0±0.3 (n=5)	0.61±0.25 (n=5)	0.38±0.13 (n=5)
T	84.9±5.8 (n=13)	8.9±5.1 (n=13)	6.2±2.5 (n=13)	79.6±10.5 (n=12)	10.4±6.5 (n=12)	9.98±4.1* (n=12)
L	82.4±6.5 (n=12)	9.98±4.5 (n=12)	7.7±3.8 (n=12)	76.0±10.7 (n=18)	12.6±7.3 (n=18)	11.4±4.4 **(n=18)

V= vvt, T= trombocita, L= limfocita, átlag \pm SEM. Student t-teszt *p < 0.025, **p < 0.01

27. táblázat ApoE genotípus és allél gyakoriságok a kontroll és Alzheimer-kóros populációkban.

apoE genotípus		
E2/E2	1 (1.4%)	-
E2/E3	6 (8.5%)	4 (6.3%)
E2/E4	1 (1.4%)	-
E3/E3	50 (70.4%)	32 (50.0%)
E3/E4	13 (18.3%)	23 (35.9%)
E4/E4	-	5 (7.8%)
apoE allél		
E2	9 (6.3%)	4 (3.1%)
E3	119 (83.8%)	91 (71.1%)
E4	14 (9.9%)	33 (25.8%)

χ^2 teszt: 12.088, d.f.=2, p<0.002

Az egyes sejtfeleségekre jellemző AChE formák szedimentációs koefficiense nem mutatott eltérést a vizsgált csoportokban (25. táblázat). Az egyes molekuláris formák százalékos megoszlását vizsgálva azonban (26. táblázat), az A12-es, aszimmetrikus forma arányának jelentős fokú növekedését figyeltük meg elsőként az irodalomban az AK-os betegek limfocitáiban (148%) és trombocitáiban (161%). Eredményeink szerint a AK-os betegek limfocitáiban és trombocitáiban a KIR-hez hasonló eltérések fordulnak elő, hiszen az agyban is az aszimmetrikus A8-as és A12-es izoformák növekedéséről számoltak be más munkacsoportok (Atack és mtsai 1983; Younkin és mtsai 1986; Siek és mtsai 1990). Az általunk a limfocitákban és trombocitákban leírtaknál azonban jóval nagyobb mértékű, akár 400%-os A8-as és A12-es izoforma növekedést találtak a KIR-ben ezek a szerzők. Másrészt az is ismert, hogy az AK specifikus neuropatológiai eltérésekben is az aszimmetrikus AChE molekulaformák jelenléte dominál. A KIR-i aszimmetrikus formák arányának növekedését az axonális transzport folyamatok károsodásával és a preszinaptikus kolinerg végződések degenerációjával hozzák összefüggésbe (Fishman és mtsai 1986), de az általunk megfigyelt, a vér alakos elemeiben zajló jelenséget nem tudjuk magyarázni jelenlegi ismereteink szerint. Feltételezhetjük a membrán kötött formák esetében lipid mikrokörnyezetük változásait, de felmerülhet lehetséges okként az enzim térbeli konformációs változása is (Lee 2004). Ez utóbbi feltételezést támasztja alá az a KIR-i megfigyelés, hogy az AK-os betegek agyában található AChE jobban glikozilált, és így hidrofób tulajdonságai fokozódásával az SzP-ok kiindulási magja is lehet (Saez-Valero és mtsai 2003).

In vitro kísérletes adatok bizonyítják, hogy az AChE-ok különböző molekuláris formái eltérő mértékben gátolhatók a ChE gátló vegyületekkel (Mimori és mtsai 1997). Az a felismerésünk, hogy az AK-os betegek limfocitái és trombocitái az aszimmetrikus AChE formákból tartalmazzak többet, hatással lehet az AK terápiájában is használt ChE gátló gyógyszerek farmakokinetikájának és farmakodinámiájának, valamint hatás és mellékhatás profiljának jobb megértéséhez, továbbá új AChE gátló molekulák tervezéséhez.

A vizsgálati személyek apoE genotípusait és allél frekvenciáit meghatározva, a korábbi vizsgálati értékeinkhez közelítő, 26%-os E4 allél gyakoriságot találtunk (27. táblázat) (Kálmán és mtsai 1996a,b, 1997, 2003; McConathy és mtsai 1997, Juhász és mtsai 2005a,b). Eredményeink szerint a BChE gén K-allélja nem volt gyakoribb az AK csoportban, és az apoE gén E4-es allélja és a BChE gén K-allélja között nem volt kimutatható interakció az általunk vizsgált magyar populációkban (Rakonczay és mtsai 2005).

A BChE enzimnek különböző fiziko-kémiai tulajdonságokkal, eltérő katalitikus aktivitásokkal rendelkező variánsai ismertek (Kalow 2004). Az enzim K variánsának aktivitása harmada a normál értékeknek (La Du és mtsai 1990). A K-variáns csökkent acetilkolin bontó

hatása kedvező lehet az AK-ban előforduló kolinerg hipofunkció szempontjából. Másrészt, AK-ban emelkedett KIR-i BChE aktivitás mutatható ki. Ezek a szempontok voltak az okai, hogy az enzim K-alléljának előfordulását többen vizsgálták és próbálták kapcsolatba hozni az AK-val (Palotás és Kálmán 2006). A K variánssal kapcsolatos polimorfizmus vizsgálatunk eredményei nem támaszják alá ezt a feltételezést a magyar populációban, és megerősítik a más etnikumokon végzett vizsgálatok negatív eredményeit (Hiltunen és mtsai 1998; Yamamoto és mtsai 1999; Lee és mtsai 2000). Fontosnak tartom megemlíteni, hogy a BChE-K SNP tekintetében a finn populációban sem találtak AK összefüggést és apoE SNP interakciót (Hiltunen és mtsai 1998).

Összefoglalva, eredményeink elsőként bizonyították, hogy az AChE enzim molekuláris formáinak aránya a KIR-i elváltozásokhoz hasonlóan, az aszimmetrikus formák irányába tolódik el az AK-os betegek trombocitáiban és limfocitáiban (Rakonczay és mtsai 2005). Kísérleteink adatai további bizonyítékokat nyújtanak annak irányában, hogy az AK egy szisztémás, nem csak a KIR-t érintő megbetegedés. Eredményeink szerint a BChE gén K variánsának polimorfizmusa nem AK specifikus, és nincs interakcióban az apoE gén E4-es alléljának öröklésével sem a magyar populációban.

3.13. Hogyan változik a szérum AChE és BChE enzimek aktivitása IIb típusú hiperlipidémiában? Van-e kapcsolat az apoE gén E4 alléljának öröklése és a ChE enzimek aktivitása között?

A membránok koleszterin tartalma modulálja a kolinerg neurotranszmisszió működését is (Zhu és mtsai 2006) és hatással van pl. a nikotinerg acetilkolin receptorok működésére is (Campagna és Fallon 2006), a kolinészterázok működése szempontjából azonban kevés adattal rendelkezünk. *In vitro* kísérletes adatok igazolták, hogy az agyban, de különböző más szervekben, így a vérünkben is előforduló ChE-ok aktivitását befolyásolja mikrokörnyezetük. Az enzimek aktivitását módosíthatja döntően hidrofób mikrokörnyezetének és aktív centrumának konformáció változása (Saez-Valero és mtsai 2003) és ezek a moduláló körülmények *in vivo* is kialakulhatnak. Az AK-os betegek agyában például, a SzP-okban és a NFF-okban található formák AChE gátló vegyületek iránti érzékenysége csökkent (Geula és Mesulam 1989; Rakonczay 2003). Az AK farmakoterápiájában jelenleg is használunk AChE gátló gyógyszereket, sajnos limitált eredményekkel. Ahhoz, hogy hatékonyabb AChE gátló molekulákat lehessen tervezni, az enzim viselkedését olyan patológias körülmények között fontos megismernünk, amelyek a demens betegeknél is gyakran előfordulnak. A korábban bemutatott kísérletes adataink (diétás kísérletek) is bizonyították, hogy a fehérjék hidrofób mikrokörnyezetének experimentális modifikációja hatással van a működésükre (Kálmán és mtsai 1992, 2001; Bjelík és mtsai 2006a, b), ezért következő vizsgálatunkban egy „természetes”, időskorban is gyakori betegségcsoport, a hiperlipidémiák ChE enzim aktivitást modifikáló

hatásának megismerését tűztük ki célul (Kálmán és mtsai 2004a,b).

28. táblázat A kontroll és hiperlipidémiás személyek szérumból lipid értékei valamint AChE és BChE aktivitása (átlag \pm SD).

	Kontroll (n = 55)	Hiperlipidémia (n = 55)	t	Szabadságfok	p érték
Szérumból koleszterin (mmol/l)	4.9 \pm 0.74	7.2 \pm 0.83	15.709	108	0.0001
Szérumból triglicerid (mmol/l)	1.6 \pm 0.88	2.4 \pm 1.3	3.567	108	0.001
Szérumból AChE (nmol/perc/mg fehérje)	0.54 \pm 0.24	0.46 \pm 0.19	1.859	108	0.066
Szérumból BChE (nmol/perc/mg fehérje)	35.6 \pm 15.9	49.6 \pm 25.0	3.513	108	0.001

Egymintás t-próba. t = a teszt számított értéke.

Eredményeink szerint (28. táblázat), a hiperlipidémiás személyek szérumból koleszterin és a szérumból triglicerid értékei szignifikánsan magasak voltak, ezért a nemzetközi beosztás szerint IIb típusú alcsoportnak tekintettük őket. A IIb típusú hiperlipidémiás csoport szérumból BChE aktivitása is szignifikánsan emelkedett volt, a szérumból AChE aktivitás pedig szignifikancia értékhez közeli mértékben csökkent ugyanebben a csoportban.

Az apoE gén E4-es allélja szignifikánsan gyakrabban (14%) fordult elő (29. táblázat) a hiperlipidémiás betegeknél, mint a KT csoportban, gyakorisága azonban elmaradt a korábbi vizsgálatainkban az AK-os betegeknél leírt értékeknél (23-28%) (Kálmán és mtsai 1997; 2003; McConathy és mtsai 1997; Juhász és mtsai 2005a,b; Hartai és mtsai 2006).

29. táblázat ApoE genotípusok és allél frekvenciák a kontroll és hiperlipidémiás betegcsoportokban.

apoE genotípus*	Kontroll (n = 55)	Hiperlipidémia (n = 55)
2 / 2	2 (4%)	-
2 / 3	6 (11%)	2 (4%)
3 / 3	39 (71%)	38 (69%)
3 / 4	8 (14%)	15 (27%)
apoE allél [#]		
2	10 (9%)	2 (2%)
3	92 (84%)	93 (84%)
4	8 (7%)	15 (14%)

* χ^2 teszt = 6.143, szabadságfok = 3, p < 0.105,

[#] χ^2 teszt = 7.469, szabadságfok = 2, p < 0.024,

ApoE 4/4 genotípus nem fordult elő a csoportokban.

Amennyiben az apoE genotípusok megoszlása szerint vizsgáltuk a szérumból lipid és ChE aktivitás értékeket (30. táblázat), a szérumból koleszterin szintek szignifikáns emelkedő tendenciáját figyelhetjük meg az E3 és E4 allélok öröklésével. Ez az összefüggés a szérumból triglicerid szintek esetében nem volt igazolható. Az AChE és BChE enzimek esetében is apoE genotípus-függő aktivitás változást figyeltünk meg (ellentétes előjellel), de egyik enzim esetében sem érték el változások a szignifikancia szintet. Amennyiben az E4 allél hordozása és nem

hordozása szerint csoportosítottuk a vizsgálati személyeket, csak a szérumban a koleszterin szintek tekintetében találtunk szignifikáns emelkedést az E4 allélt hordozóknál (31. táblázat).

30. táblázat A szérumban a lipid szintek valamint AChE és BChE enzim aktivitások a különböző apoE genotípust hordozó személyeknél. Átlag \pm SD.

	apoE 2/2 (n = 2)	apoE 2/3 (n = 8)	apoE 3/3 (n = 77)	apoE 3/4 (n = 23)	F	d.f.	p
Szérumban koleszterin (mmol/l)	4.2 \pm 1.2	5.2 \pm 1.2	6.0 \pm 1.4	6.6 \pm 1.4	3.658	3	0.015
Szérumban triglicerid (mmol/l)	1.9 \pm 1.7	2.2 \pm 2.0	2.0 \pm 1.0	2.2 \pm 1.5	0.253	3	0.859
Szérumban AChE (nmol/perc/mg fehérje)	0.65 \pm 0.44	0.53 \pm 0.25	0.50 \pm 0.23	0.48 \pm 0.15	0.409	3	0.747
Szérumban BChE (nmol/perc/mg fehérje)	30.3 \pm 13.5	40.2 \pm 20.6	42.8 \pm 22.3	43.8 \pm 23.1	0.259	3	0.855

Varianciaanalízis Bonferroni próbával.

apoE 2/2 vs. apoE 2/3, $p < 1.0$; apoE 2/2 vs. apoE 3/3, $p < 0.42$; apoE 2/2 vs. apoE 3/4, $p < 0.11$, F = az F próba értéke, d.f. = szabadságfok.

31. táblázat A szérumban a lipid szintek valamint AChE és BChE enzim aktivitások a különböző apoE gén E4-es és E2-E3 allélt hordozó személyeknél. Átlag \pm SD.

	apoE2-3 hordozó (n = 87)	apoE4 hordozó (n = 23)	t	Szabadságfok	p
Szérumban koleszterin (mmol/l)	5.9 \pm 1.4	6.7 \pm 1.4	2.248	108	0.027
Szérumban triglicerid (mmol/l)	2.0 \pm 1.1	2.2 \pm 1.5	0.691	108	0.491
Szérumban AChE (nmol/perc/mg fehérje)	0.50 \pm 0.24	0.48 \pm 0.15	0.497	108	0.621
Szérumban BChE (nmol/perc/mg fehérje)	42.3 \pm 21.9	43.8 \pm 23.1	0.306	108	0.760

t-próba. t = a t-próba értéke; d. f. = szabadságfok

Eredményeink szerint a IIb típusú hiperlipidémiában a szérumban ChE enzimek aktivitása ellentétes előjellel változik meg, a BChE aktivitása fokozódik az AChE-é pedig csökken. Az általunk megfigyeltetkhez hasonlóan, emelkedett szérumban BChE aktivitást találtak IIa, IIb és IV típusú hiperlipidémiákban is más szerzők (Cucuianu és mtsai 1975; Chu és mtsai 1978; Jain és mtsai 1983).

Kísérleti eredményeink alapján sajnos nem lehet eldönteni, hogy a ChE enzimek aktivitásának változása a szérumban triglicerid vagy koleszterin szint eltérésekkel hozható összefüggésbe (31. táblázat). Egyes vizsgálatok szerint a triglicerid szintekkel mutat kapcsolatot a BChE enzim aktivitásának emelkedése (Cucuianu és mtsai 1975 és 1976), míg mások eredményei a HDL és LDL koleszterin szintekkel való összefüggést igazolták (Kutty és mtsai 1981). További vizsgálatok szükségesek a probléma eldöntéséhez.

Azt, hogy hogyan, milyen mechanizmus révén járul hozzá a szérumban koleszterin és/ vagy a triglicerid szintek emelkedése a BChE enzim aktivitásnak fokozódásához, még nem tudjuk mai

tudásunk alapján megválaszolni. Közvetlen fiziko-kémiai, és közvetett génexpressziót, metabolizmust reguláló hatások, ill. ezek interakciói feltételezhetőek.

Fontos megemlítenünk, hogy a ChE lipid anyagcsere interakció fordított módon is érvényesülhet, azaz a BChE enzimnek a KIR-i kolinerg hatásai mellett szerepet tulajdonítanak a lipid anyagcsere szabályozásában is (Kutty és Payne 1994). Ezeknek az összefüggéseknek nemcsak az AK, hanem a kardiovaszkuláris betegségek és a cukorbetegség mechanizmusa, terápiája szempontjából is jelentőségük lehet. Hipertrigliceridémiás cukorbetegség esetében például csökkent szérumbChE enzim aktivitást találtak (Rustemeijer és mtsai 2001), és experimentális diabétesz mellitusz esetén is megerősítették ezt a megfigyelést (Annapurna és mtsai 1991).

Az irodalomban elsőként foglalkoztunk a szérumbChE aktivitások és az apoE allélok kapcsolatával, a szérumbChE profil figyelembe vételével. Adataink szerint a szérumbChE szintek emelkedésével járó BChE aktivitás csökkenés nem apoE allél és dózis függő. Rustemeijer és mtsai (2001) hasonló, negatív eredményt találtak II-es típusú diabétesz mellitusz esetében.

Eredményeink az AK patomechanizmusa és terápiája szempontjából is fontosak lehetnek. Hiperlipidémia nem csak a VD, hanem a gyakori kevert AK és VD, továbbá AK esetében is előfordul. Eredményeink alapján feltételezhető, hogy a hiperlipidémiás demens személyek más dózisú vagy kinetikájú ChE gátló kezelést igényelnek, mint a nem diszlipidémiás demencia alcsoportok. A kérdés megválaszolásához további célzott farmakológiai vizsgálatok szükségesek.

Összefoglalva, eredményeink megerősítették a korábbi adatokat arra vonatkozóan, hogy a IIb típusú hiperlipidémia fokozott BChE enzim aktivitással jár (Kálmán és mtsai 2004a,b). Elsőként igazoltuk, hogy ez a kapcsolat nem E4-es allél függő. Adataink a szérumbChE értékek fontosságára hívják fel a figyelmet az AK és VD ChE gátló farmakoterápiájával kapcsolatban.

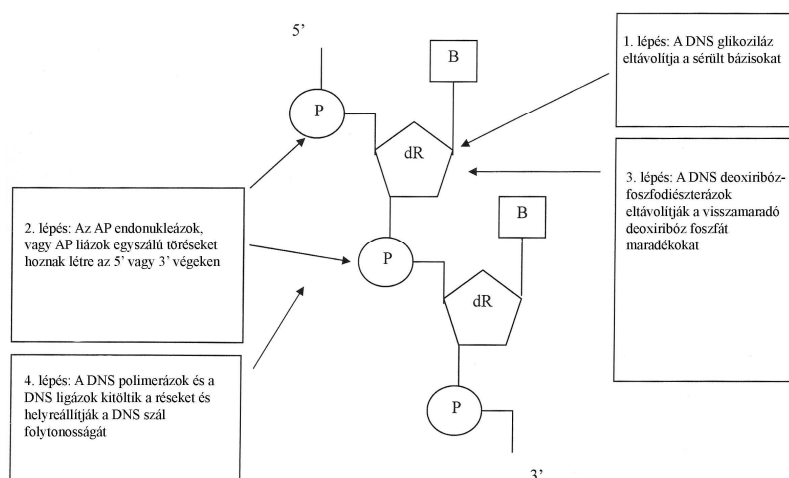
3.14. Az oxidatív stressz milyen mértékű és jellegű DNS károsodást okoz különböző korú Down-kóros személyek limfocitáiban?

A 21-es kromoszóma trisómiájával vagy transzlokációjával járó DK-t az AK természetes modell betegségének tekintjük, hiszen a DK-os személyek többsége akár már 40 éves életkoruk felett az AK neuropatológiai és klinikai tüneteit mutatja (Mann és mtsai 1990; Zana és mtsai 2006). A DK „gén dózis hatás” hipotézise szerint a 21-es kromoszómán található gének extra példányainak jelenléte, az általuk kódolt fehérjék fokozott mértékű szubsztát fogyasztását, valamint következményes túltermelését vonja maga után, és fokozott mértékű oxidatív károsodáshoz vezet. Ezeket a folyamatokat okként feltételezik a DK sajátos

elváltozásainak: az AK kialakulásának, a fertőzések iránti fogékonyságnak, és egyes tumorok gyakoribb előfordulásának hátterében (Korenberg és mtsai 1990; Mann és mtsai 1990).

Az AK-ban és DK-ban az oxidatív ártalom számos jele kimutatható (Kálmán és mtsai 1999; Schuessel és mtsai 2004; Zhu és mtsai 2004a; Zana és mtsai 2006a). Mind a lipidek, mind a proteinek és a DNS esetében is találtak szabadgyökök által okozott változásokat (Mecocci és mtsai 1994; Gabbita és mtsai 1998). A DNS oxidatív károsodása kimutatható az AK-os betegek agyában; hasonló rendellenességeket azonban nem találtak a DK-os személyek KIR-ében (Seidl és mtsai 1997). A DK-os egyének limfocitái is számos ártalom hordozói. Csökkent B és T helper sejtszámot mutattak ki, ugyanakkor az NK és a citotoxikus T limfociták száma megnövekedett (Morale és mtsai 1992). A T sejtekben csökkent cAMP és emelkedett cGMP szinteket találtak továbbá (Tam és Walford 1980), és mitogén stimulációra adott osztódási válaszuk is gyorsabb, mint a KT személyeké (Morimoto és mtsai 1984). Korábbi vizsgálataink szerint az AK-os betegek limfocitáinak DNS-e nagymértékű oxidatív károsodást hordoz, és ezt a megfigyelésünket mások is megerősítették (Mórocz és mtsai 2002; Kadioglu és mtsai 2004; Migliore és mtsai 2005). Mivel a DK-os személyek limfocitái esetében az oxidatív DNS károsodás mértéke nem tisztázott és a folyamat korfüggőségéről sem rendelkezünk adatokkal, ezért következő vizsgálatunk célja ezeknek a kérdéseknek a megválaszolása volt (Zana és mtsai 2006b).

Eredményeinket a 32-34. táblázatok mutatják be. A 32. táblázatban látható, hogy a DK-os személyek (gyermekek és felnőttek együtt) limfocitái már alapállapotban szignifikánsan nagyobb mennyiségben tartalmaztak oxidált purinokat és pirimidineket, mint a KT személyek limfocitái.



13.ábra A DNS bázisok oxidatív DNS károsodását követő excíziós javító mechanizmusok. Az egyszerűség kedvéért csak a DNS molekula egyik szála van feltüntetve az ábrán. AP, bázis nélküli hely; B, bázis (adenin, timin, citozin vagy guanin); dR, deoxiribóz; P, foszfát.

A DK-os gyermekek limfocitáinak oxidatív DNS károsodását külön vizsgálva (33. táblázat) a kísérletes OS és a repair állapotokat követő méréseinkben minden vizsgált (oxidatív DNS károsodásra utaló) paraméterben szignifikáns emelkedést tapasztaltunk. A H_2O_2 -indukált és a javítás után megmaradó oxidált purinok mennyisége is szignifikánsan nőtt a DK-os gyermekeknél a kor- és nem szerint illesztett KT-jaikhoz viszonyítva. A felnőtt DK személyek esetében sem a peroxid-kezelés hatására, sem az azt követő repair szakaszban nem volt kimutatható oxidatív DNS károsodás egyik vizsgált paraméter vonatkozásában sem (34. táblázat).

Az irodalomban elsőként vizsgáltuk meg és hasonlítottuk össze a DK-os gyermekek és felnőttek oxidatív DNS károsodásának mértékét (Zana és mtsai 2006b). Eredményeink szerint DK-ban a limfociták oxidatív stressz érzékenysége és DNS károsodása fokozott mértékű. Gyermekkorban kifejezett deficit mutatható ki, majd az életkor előrehaladtával normalizálódnak az említett paraméterek. Takeshita és mtsai (1992) hasonló, korfüggően csökkenő érzékenységet írtak le röntgen besugárzást követő kromoszóma aberrációk tekintetében DK-os limfocitákon. A DK-os limfociták életkor függő OS érzékenységét magyarázhatja a túlérzékeny sejtek kisselektálódása.

Az a megfigyelésünk, hogy a DK-os gyermekek és felnőttek limfocitáiban, életkortól függetlenül, nyugalmi állapotban is kimutatható a DNS fokozott oxidatív károsodása (33-34 táblázatok), megerősíti mások adatait arra vonatkozóan, hogy a DK-ban előforduló oxidatív károsodás szisztémás jellegű, és nem csak a KIR-re korlátozódik (Muchova és mtsai 2001; Pastore és mtsai 2003; Zitnanova és mtsai 2004). Továbbá, a DK-os személyek limfocitáinak nyugalmi állapotában megfigyelt oxidatív DNS károsodás hasonló jellegű és mértékű, mint amiről korábban mi és mások is beszámoltak az AK betegek esetében (Mórocz és mtsai 2002; Kadioglu és mtsai 2004; Migliore és mtsai 2005), megerősítve a két betegség közötti hasonlóságokat (32. táblázat). Az AK és DK limfociták DNS-ének hasonló jellegű elváltozásait magyarázhatja a sejtek emelkedett APP tartalma, amely az APP kóros expressziójára vagy poszt-transzlációs processzingjére vezethető vissza (Pallister és mtsai 1997). A két neurodegeneratív betegség közötti párhuzamok szempontjából fontos, hogy az APP gén mellett a SOD gén is a 21-es kromoszómán található, és ez is fokozott mértékben expresszálódik DK-ban, sőt a legújabb kutatások szerint az AK patogenezisében is szerepet játszik, mivel a SOD aggregátumok kimutathatóak a szenilis plakkokban (Choi és mtsai 2005; Zana és mtsai 2006a). Az AK-os és DK-os személyek limfocitái nemcsak az oxidatív DNS károsodás jeleit mutatják, hanem citokin termelésük is megváltozott (Kálmán és mtsai 1997; Park és mtsai 2000), továbbá a CD4-pozitív sejtek Ca^{2+} szignalizációs deficitje is igazolt (Grossmann és mtsai 1993). Az azonban nem ismert, hogy az említett limfocita funkciók zavarok kapcsolatba hozhatók-e a

sejtek DNS-ének oxidatív károsodásával, és hogy kapcsolatuk természete ok, vagy okozati jellegű-e.

32. táblázat Az oxidatív DNS károsodás mértéke DK-os és KT személyek limfocitáiban (gyermek és felnőtt alcsoportok közösen) (%-ok átlaga \pm SEM).

Kísérleti körülmények	Kontroll (n = 25) DNS farok%	Down kór (n = 25) DNS farok%	Szignifikancia p^a érték	Az interakció szignifikancia értéke p^b
Alapállapot egyszálú DNS törések	8.7 \pm 0.4	9.1 \pm 0.6	0.42	0.53
Alapállapot egyszálú DNS törések + oxidált pirimidinek (EndoIII hasítási helyek)	9.8 \pm 0.5	11.2 \pm 0.6	0.04	0.37
Alapállapot egyszálú DNS törések + oxidált purinok (Fpg hasítási helyek)	11.2 \pm 0.5	13.2 \pm 0.7	0.02	0.66
H ₂ O ₂ indukált oxidatív DNS károsodás egyszálú DNS törések	26.0 \pm 1.6	29.0 \pm 1.2	0.04	0.07
H ₂ O ₂ indukált oxidatív DNS károsodás egyszálú DNS törések + oxidált pirimidinek (EndoIII hasítási helyek)	29.0 \pm 1.6	33.0 \pm 1.4	0.02	0.06
H ₂ O ₂ indukált oxidatív DNS károsodás egyszálú DNS törések + oxidált purinok (Fpg hasítási helyek)	32.3 \pm 1.6	37.5 \pm 1.8	0.007	0.07
A repair után megmaradt egyszálú DNS törések	19.0 \pm 1.2	21.9 \pm 1.1	0.02	0.06
A repair után megmaradt egyszálú DNS törések + oxidált pirimidinek (EndoIII hasítási helyek)	21.0 \pm 1.2	23.6 \pm 1.2	0.02	0.02
A repair után megmaradt egyszálú DNS törések + oxidált purinok (Fpg hasítási helyek)	25.3 \pm 1.3	29.7 \pm 1.4	0.004	0.02

^a Kétszemponyos ANOVA.

^b A KT és DK csoportok és a korcsoportok közötti interakciók szignifikancia értékei.
endonukleáz III (EndoIII); formamidopirimidin DNS-glikoziláz (Fpg)

Az oxidatív DNS károsodás kijavításának legfontosabb mechanizmusa a nukleotid bázisok cseréje (13. ábra) (Seeberg és mtsai 1995). Adataink szerint a purin bázisok fogékonyabbak az oxidatív károsodásra, mint a pirimidin bázisok és javítási mechanizmusaik is lassabbak (32-34. táblázatok). Hasonló eredményeket figyeltek meg *in vitro* körülmények között más szerzők (Jaruga és Dizdaroglu 1996; Migliore és mtsai 2005), és mi is AK-os betegek limfocitáin korábban (Mórocz és mtsai 2002).

Az oxidatív DNS károsodások javítását túlnyomó részben végző bázis excíziós repair rendszer kapacitását (13. ábra) korábban még nem tanulmányozták DK-os limfociták esetében. Eredményeink szerint a DK személyek repair kapacitása az életkortól függetlenül sem tér el a KT csoporttól.

33. táblázat Az oxidatív DNS károsodás mértéke DK-os és KT gyermekek limfocitáiban (DNS csóva %-ok átlaga \pm SEM)

Kísérleti körülmények	Kontroll n = 7	Down-kór n = 7	p
Alapállapot egyszálú DNS törések	8.4 \pm 0.5	9.6 \pm 1.4	0.40
Alapállapot egyszálú DNS törések + oxidált pirimidinek (EndoIII hasítási helyek)	9.4 \pm 0.4	11.9 \pm 1.4	0.09
Alapállapot egyszálú DNS törések + oxidált purinok (Fpg hasítási helyek)	10.5 \pm 0.3	13.1 \pm 1.5	0.12
H ₂ O ₂ indukált oxidatív DNS károsodás egyszálú DNS törések	23.0 \pm 1.2	31.7 \pm 2.3	0.02
H ₂ O ₂ indukált oxidatív DNS károsodás egyszálú DNS törések + oxidált pirimidinek (EndoIII hasítási helyek)	25.3 \pm 1.2	35.7 \pm 2.2	0.01
H ₂ O ₂ indukált oxidatív DNS károsodás egyszálú DNS törések + oxidált purinok (Fpg hasítási helyek)	28.3 \pm 1.8	40.7 \pm 2.6	0.008
A repair után megmaradt egyszálú DNS törések	16.0 \pm 1.3	24.0 \pm 2.1	0.01
A repair után megmaradt egyszálú DNS törések + oxidált pirimidinek (EndoIII hasítási helyek)	17.5 \pm 1.3	26.3 \pm 2.1	0.007
A repair után megmaradt egyszálú DNS törések + oxidált purinok (Fpg hasítási helyek)	21.0 \pm 1.5	32.6 \pm 2.3	0.002

Összehasonlítások LSD módszerrel történtek

A "fő"/statistikai szempontból lényeges p értékeket dőlt számok jelzik(a többi értéket a teljesség kedvéért tüntettük fel)

endonukleáz III (EndoIII); formamidopirimidin DNS-glikoziláz (Fpg)

34. táblázat Az oxidatív DNS károsodás mértéke DK-os és KT felnőttek limfocitáiban (DNS csóva %-ok átlaga \pm SEM).

Kísérleti körülmények	Kontroll n = 18	Down-kór n = 18	p
Alapállapot egyszálú DNS törések	8.8 \pm 0.6	9.0 \pm 0.6	0.87
Alapállapot egyszálú DNS törések + oxidált pirimidinek (EndoIII hasítási helyek)	10.0 \pm 0.6	11.0 \pm 1.0	0.29
Alapállapot egyszálú DNS törések + oxidált purinok (Fpg hasítási helyek)	11.5 \pm 0.7	13.3 \pm 1.2	0.08
H ₂ O ₂ indukált oxidatív DNS károsodás egyszálú DNS törések	27.2 \pm 2.1	27.9 \pm 1.4	0.76
H ₂ O ₂ indukált oxidatív DNS károsodás egyszálú DNS törések + oxidált pirimidinek (EndoIII hasítási helyek)	30.5 \pm 2.1	31.9 \pm 1.7	0.58
H ₂ O ₂ indukált oxidatív DNS károsodás egyszálú DNS törések + oxidált purinok (Fpg hasítási helyek)	33.9 \pm 2.1	36.3 \pm 2.2	0.40

A repair után megmaradt egyszálú DNS törések	20.2 ± 1.5	21.0 ± 1.4	0.59
A repair után megmaradt egyszálú DNS törések + oxidált pirimidinek (EndoIII hasítási helyek)	22.4 ± 1.5	22.6 ± 1.4	0.91
A repair után megmaradt egyszálú DNS törések + oxidált purinok (Fpg hasítási helyek)	26.9 ± 1.5	28.6 ± 1.7	0.62

A páronkénti összehasonlítások LSD módszerrel történtek

A "fő"/statisztikai szempontból lényeges p értékeket dőlt számok jelzik; a többi értéket a teljesség kedvéért tüntettük fel

endonukleáz III (EndoIII); formamidopirimidin DNS-glikoziláz (Fpg)

Összefoglalva, a genomikus DNS életkortól független oxidatív károsodását elsőként írtuk le DK-os személyek limfocitáiban, oxidatív stressz indukcióra adott normál repair kapacitás mellett (Zana és mtsai 2006b). A DK-os gyermekek limfocitáiban található genomikus DNS szelektív és fokozott oxidatív stressz érzékenységet is kimutattuk. Eredményeink az oxidatív károsodások szisztémás jellegére, a limfocita DNS korai károsodására és a gyermekek fokozott oxidatív stressz érzékenysége hívják fel a figyelmet DK-ban, ezen kívül megerősítik az oxidatív DNS károsodás közös patoplasztikus szerepét mind az AK, mind a DK vonatkozásában.

3.15. Milyen mértékben fogékonyak az AK-os betegek limfocitái az UVB fény kiváltott apoptotikus sejthalálra?

Az AK patomechanizmusában az apoptotikus sejthalál szerepét is feltételezik (Higami és Shimokawa 2000; Kálmán és mtsai 2000b; Schindowski és mtsai 2003; Takuma és mtsai 2005) és erre számos bizonyítékot is találtak mind a KIR-ben, mind a perifériás szövetekben (Migliore és mtsai 2005; Zana és mtsai 2006a).

Az apoptotikus szignál kaszkád egyik elindítója a sejtek intracelluláris Ca^{2+} szintjének emelkedése (Takuma és mtsai 2005). AK-os betegek limfocitáiban például a mitogén stimulus megnövekedett intracelluláris Ca^{2+} szinteket vált ki, ezáltal fogékonyra téve a sejteket a kaszpáz kaszkád rendszer aktivációjára (Sulger és mtsai 1999). A BAP-ről is kimutatták, hogy megemeli a limfociták intracelluláris Ca^{2+} szintjét, azon kívül, más mechanizmusok révén OS-t is okoz és így növeli az apoptózis kialakulásának rizikóját (Velez-Pardo és mtsai 2002). Az AK-os limfociták oxidatív károsodását jelzi Mecocci és mtsai (1998) megfigyelése, akik a DNS oxidatív károsodására utaló emelkedett 8-hidroxi-2'-deoxiguanozin szinteket mutattak ki a betegek limfocitáiban.

Az UVB fényről bizonyított, hogy apoptotikus sejtpusztulást válthat ki közvetlenül a sejthalálért felelős receptorok aktiválása, vagy közvetve, reaktív szabadgyökök létrehozása és a következményes oxidatív sejtkárosodás révén (Kulms és Schwarz 2002). Kísérleteink következő szakaszában ezért AK-os betegek limfocitáinak apoptotikus válaszát vizsgáltuk meg különböző dózisú UVB sugárzásra, *in vitro*. Eredményeinket a 35. táblázat foglalja össze.

35. táblázat Az UVB-indukált apoptózis mértéke kontroll és AK betegek limfocitáiban (átlag \pm SD).

UVB dózis mJ/cm ²	Apoptózis mértéke (az alapérték %-a)		
	Kontroll (n=12)	Alzheimer-kór (n=22)	<i>p</i>
0	3.13 \pm 1.70	3.81 \pm 1.82	0.840
100	55.52 \pm 9.42	35.04 \pm 8.68	0.0001
200	69.40 \pm 6.87	51.76 \pm 9.48	0.0001
300	69.40 \pm 6.87	55.81 \pm 9.76	0.0001

Az UVC (254 nm) sugárzás hatását összesen két másik vizsgálat tanulmányozta korábban az AK-os limfociták vonatkozásában, de egyik sem közvetlenül az apoptózis mértékét elemezte. Kiseb UVC dózisokat alkalmazva sem Robbins és mtsai (1985), sem Parshad és mtsai (1996) nem találtak eltérést kromatin töredezettség és életképesség tekintetében AK ill. transzformált AK-os limfocitákban.

Eredményeink szerint a nyugalmi apoptózis arány tekintetében nem találtunk különbségeket az AK-os és KT csoportok T limfocitái között. Meglepetésre, az UVB kiváltott apoptózissal szemben az AK-os betegek limfocitái szignifikánsan és dózis-függően ellenállóbbnak bizonyultak, mint a KT személyeké (Zana és mtsai 2005).

Eredményeinket többféle módon magyarázhatjuk. Egyrészt lehetséges, hogy az AK-os betegek limfocitáinak apoptotikus kaszkád mechanizmusa másképpen működik (az AK „kettős csapás” hipotézise és bizonyítékai). Ezzel feltételezéssel kapcsolatosan érdemes megemlíteni, hogy az AK-os betegek limfocitáinak osztódási sebessége elmarad a KT személyekétől (Lombardi és mtsai 1999) és a lassult osztódási sebesség kisebb apoptotikus érzékenységet jelenthet. A másik lehetséges magyarázat az AK-os betegek immunrendszerének fokozott aktivitása lehet. Feltételezhető, hogy a betegek agyában zajló krónikus gyulladásos folyamat (Kálmán és mtsai 2000a) az immunrendszert, és így a perifériás T limfocitákat is aktiválhatja, az aktivált sejtek pedig ellenállóbbak lehetnek az UVB sugárzás által kiváltott oxidatív károsodással és apoptotikus szignalizációs aktivációval szemben.

Összefoglalva, az irodalomban elsőként bizonyítottuk az AK-os betegek limfocitáinak UVB-indukált csökkent apoptotikus érzékenységét (Zana és mtsai 2005). Eredményeink megerősítik a korábbi megfigyeléseket arra vonatkozóan, hogy az AK egy szisztémás jellegű megbetegedés, és patomechanizmusában az apoptózis kaszkád eltérései is szerepet játszhatnak.

3.16. Milyen génexpressziós eltérések mutathatók ki az AK-os betegek limfocitáiban?

Saját korábbi adataink és mások eredményei is valószínűsítik, hogy az AK egy szisztémás megbetegedés, azaz a KIR mellett a periférián is kimutathatóak eltérések. Méréseink szerint a vér alakos elemei közül a trombocitákban és a limfocitákban is jelen vannak változások: a membránok fiziko-kémiai tulajdonságai és összetétele (Kálmán és mtsai 1994), a receptor funkciók, szignalizációs működések (Rakonczay és mtsai 2005), az APP metabolizmus peroxidatív károsodás (Zana és mtsai 2006a) és sejthalál tekintetében (Zubenko és mtsai 1989; Di Luca és mtsai 1998; Eckert és mtsai 1998; Etcheberrigaray és Bhagavan. 1999; Mórocz és mtsai 2002; Zana és mtsai 2005).

A továbbiakban, a biokémiai és lipid kutatási módszerek mellett, a gének kifejeződésének sajátosságait vizsgáltuk meg transzkriptomikai és genetikai módszerek alkalmazásával. Kísérleteinkhez a korábbi mérésekben már sikeresen alkalmazott AK-os betegekből és idős KT személyekből származó limfocitákat és pszichofarmakonokkal kezelt patkányok agyát használtuk fel modell rendszerként (Palotás és mtsai 2003a,b; Palotás és mtsai 2004a,b,c; Kálmán és mtsai 2005b; Fehér és mtsai 2005; Pákáski és mtsai 2005; Palotás és mtsai 2005; Kálmán és mtsai 2006a,b; Palotás és mtsai 2006).

Elsőként az AK betegek limfocitáinak génexpressziós profilját vizsgáltuk meg és hasonlítottuk össze idős KT személyekével (Kálmán és mtsai 2005b). Eredményeinket a 36-37. táblázatok mutatják be.

36. táblázat Az AK betegek limfocitáiban represszált gének listája.

A gén neve	Génbanki szám	A változás mértéke
Alfa 2C-1 adrenerg receptor	JO3853	0.362
<i>Homo sapiens</i> defenzin 5 gén	M97925	0,363
Ribonuclease, RNase A family	X55990	0.416
Gonadotropin releasing hormone	X01059	0.420
Human cell death protein (RIP)	U50062	0.426
Major histocompatibility complex enhancer-binding protein	M69043	0.504
Oszteomodulin	AB000114	0.512
Human TNF-related apoptosis inducing ligand TRAIL	U37518	0.513
Putative DNA binding protein A20	M59465	0.514
Cytochrome P450 subfamily I (aromatic compound-inducible) polypeptide	K03191	0.519
Carboxypeptidase M	J04970	0.519

A DNS microchip technikával megvizsgált 3200 gén közül 20 esetben találtunk szignifikáns változást expressziójukban. 12 gén represszálódott (36. táblázat), a másik 8 esetében pedig fokozott expressziót találtunk (37. táblázat). A represszált géneknél csak nagyon kismértékű 0.3-0.5x-es változásokat figyeltünk meg; a változás mértéke minden esetben az általunk önkényesen megválasztott 1.5-es határérték alatt volt (*A jelen esetben és a további kísérleteinkben is az általunk önkényesen megválasztott 1.5-es határértéket meghaladó transzkriptum változások mértékét félkövér betűtípussal tüntettük fel az értekezés eredményeit bemutató táblázatokban*). Belső standard gént (β -aktin) alkalmazva, hét önkényesen kiválasztott gén esetében QRT-PCR segítségével validáltuk az eredményeket.

Vizsgálatainkat megelőzően nem ismertünk adatokat az AK-os betegek limfocitáinak génexpressziós mintázatát illetően, hiszen a korábbi vizsgálatok többsége a KIR betegség-, illetve régióspecifikus elváltozásait vizsgálta (Pasinetti 2001; Colangelo és mtsai 2002). Ez utóbbiak az AK-os betegek agymintáinak génexpressziós elemzése során a szignál-transzdukcióval, stressz válasszal, és citoskeletonális működésekkel kapcsolatba hozható fehérjék génjeinek csökkent expresszióját mutatták ki. Saját adataink szerint, az AK betegek limfocitái esetében a vazoreguláció, immun, apoptózis, valamint anyagcsere folyamatok szabályozásáért felelős gének expressziója változik meg szignifikánsan (36-37. táblázatok).

37. táblázat Az AK-os betegek limfocitáiban fokozott mértékben expresszált gének listája.

A gén neve	Génbanki szám	A változás mértéke
Human Golgi antigen gcp372	X75304	1.960
Human galectin-4	AB006781	1.960
Fc fragment of IgE, High affinity I. receptor for β polypeptide	M89796	2.041
<i>Homo sapiens</i> cyclic nucleotide phosphodiesterase	D50640	2.100
Human insuloma rig-analogue DNA binding protein	J02984	2.299

A vazoregulációban is szerepet játszó gének közül az α_{2c} -adrenoreceptor génjének expressziója több, mint harmadára csökkent az AK-os betegek limfocitáiban. A humán limfocitákon elhelyezkedő α_{2c} -adrenoreceptorok funkcióit nem ismerjük, de működésüket több neuropszichiátriai betegség szempontjából tanulmányozták és modell értékűnek találták. Az α_{2c} -adrenoreceptorok gátló funkciójú autoreceptorként működnek a KIR-ben, az erekben pedig többek között a vazokonstrikció mechanizmusának szabályozásban vesznek részt (Chotani és mtsai 2000; Palotás és mtsai 2004c). Az AK-ban a kolinerg rendszer degenerációja mellett a noradrenerg neuronok pusztulása és hipofunkciója is kimutatható a locus coeruleusban (Zweig

és mtsai 1988). Feltételezhető tehát, hogy a α_2 -adrenoreceptor génjének csökkent perifériás expressziója hozzájárulhat az AK specifikus KIR-i hipoperfúzió patomechanizmusához.

A csökkent expressziót mutató gének közül az immun-folyamatokban résztvevőket emelhetjük ki másodikként eredményeink közül. A defenzin és a karboxipeptidáz M génjének csökkent expressziója az AK-ban megfigyelt limfocita diszfunkciókkal, citokin termelési zavarokkal (Bergman és mtsai 2002), csökkent DNS repair funkciókkal (Mórocz és mtsai 2002) hozható kapcsolatba. Az AK immunológiai hipotézise szerint a betegek agyában krónikus gyulladásos folyamat zajlik (McGeer és McGeer 2002). Arra vonatkozóan azonban nem rendelkezünk bizonyítékokkal, hogy a KIR-i immunfolyamat perifériás limfocita funkciózavarokban is megnyilvánul. Perifériás limfocitákon végzett génexpressziós kísérleteink adatainak értékelése során fontos figyelembe vennünk, hogy az általunk választott limfocita kísérleti modell természetesen nem vonható minden tekintetben párhuzamba a KIR-ben találtakkal, de bármilyen, ebben a rendszerben felismert, igazolt és mások által is megerősített megfigyelés segítheti az AK specifikus perifériás változások megértését és esetleges biológiai markerek kidolgozását.

Az AK betegek limfocitáiban megváltozott expressziójú húsz darab gén közül három funkciója az apoptotikus sejthalál regulációjával kapcsolatos. A humán sejthalál protein (RIP) az NF κ B szignalizációs rendszer részeként gátolja az apoptózist (Karran és Dyer 2001; Zana és mtsai 2006a). Mind a RIP, mind a TRAIL gének csökkent expresszióját találtuk az AK-os betegek limfocitáiban, bár ez utóbbi pro-apoptotikus hatású molekulaként ismert (Ursini-Siegel és mtsai 2002). A galektin-4 pedig a sejtek differenciációs, növekedési, valamint apoptotikus folyamataiban fejti ki hatását (Danguy és mtsai 2002) génjének fokozott expresszióját találtuk az AK-os limfocitákban. Bár QRT-PCR eredményeink nem erősítették meg a TRAIL gén represszióját az AK-os betegek limfocitáiban, adataink hasonlítanak és megerősítik az AK-os betegek agymintáiban leírt expressziós mintázati profilt, hiszen Walker és mtsai (2001) és Colangelo és mtsai (2002) szintén az apoptózis kapcsolt gének csökkent expressziójáról számoltak be korábban.

Összefoglalva, a sejthalállal, az immun folyamatokkal és a noradrenerg rendszer működésével kapcsolatos gének expressziós eltéréseit találtuk elsőként AK-os betegek limfocitáiban (Kálmán és mtsai 2005b). Transzkriptomikai vizsgálataink eredményei több szempontból is újszerűnek minősülnek, hiszen eddig nem ismert adatokról számoltunk be az AK perifériás eltéréseinek felismerése és a betegség patomechanizmusának megértése szempontjából. Eredményeink megerősítik azt a feltételezést, hogy egyszerre többirányú patogén folyamat vesz részt az AK specifikus neurodegeneratív folyamat kialakításában.

3.17. Hogyan befolyásolják az antidepresszív szerek a központi idegrendszeri génexpressziót patkányban?

Az affektív tünetek és az ebbe a pszichopatológiai csoportba tartozó depresszív szindróma a demenciák gyakori prodromális tünete és későbbi kísérő jelensége (Starkstein és mtsai 2001). A depresszió neurobiológiájával kapcsolatosan ma már tudjuk, hogy morfológiai elváltozások, pl. neuronális atrófia és sejtpusztulás is kimutatható a betegek agyában (Drevets és mtsai 1997; Malberg és mtsai 2000; Hamidi és mtsai 2004). Bár számos kísérletes és klinikai adat utal a depresszió és demencia közös patoplasztikus tényezőire, de az átfogó magyarázat hiányzik, mivel a meglévő adatok még nem kapcsolhatók teljes rendszerbe. A legfontosabb irányvonal a stressz-hatások, stressz hormonok, neuroimmunológiai tényezők és a neurodegeneratív folyamatok kapcsolatára hívja fel a figyelmet (Sapolsky 2003).

Antidepresszív hatású gyógyszereket az AK-os betegek affektív és viselkedési tüneteinek kezelésére is használunk. Az utóbbi évek kutatásai bizonyították, hogy az antidepresszívumok egyes csoportjai, a SSRI-k, SNRI-k neurotrofikus hatással is rendelkeznek, továbbá serkentik az őssejtek keletkezését és migrációját. (Malberg és mtsai 2000; Santarelli és mtsai 2003). Ezek az új hatásmechanizmusok nemcsak az affektív betegségek, hanem a neurodegeneratív zavarok, így az AK új terápiás lehetőségei szempontjából is nagy jelentőségűek. E megfontolások alapján kezdtük azokat a kísérleteinket, amelyekben különböző pszichofarmakonok génexpressziós hatásait vizsgáltuk *in vitro* és *in vivo*, továbbá az AK feltételezett patomechanizmusában központi szerepet játszó APP molekula anyagcseréjére irányuló specifikus hatásait is nyomon követtük a különböző pszichofarmakonoknak. Ötletünk eredetiségét az Innovatív Gyógyszergyártók Egyesülete 2001-ben első helyezéssel díjazta és támogatta kutatásainkat.

Első transzkriptomikai vizsgálataink célja a triciklikus szerkezetű, a noradrenalin és a szerotonin újrafelvételét gátló, imipramin és a legszelektívebb SSRI hatású citalopram akut és krónikus *in vivo* hatásának feltérképezése volt a patkány fronto-temporális agykéreg génexpressziós mintázatára (Palotás és mtsai 2004a). Eredményeinket a 38-42. táblázatok foglalják össze.

Eredményeink szerint az imipramin akut és krónikus alkalmazása relatíve kisszámú gén transzkripciójára hatott, hiszen összesen hat gént represszált, és nyolc darabot pedig fokozott mértékben expresszált a patkányok cortexében. Ezek a gének szignalizációs folyamatokban, struktúrális fehérjék kódolásában és a sejtmetabolizmus szabályozásában játszanak szerepet (38-39. táblázatok). A triciklikus antidepresszívum akut adagolása a neuronális plaszticitással és citoszkeletonnal kapcsolatos gének expresszióját módosította, míg a krónikus kezelésekben a sejtciklus és túlélés génjein figyeltük meg hatását.

38. táblázat Az akut (96 óra) (A) és krónikus (4 hét) (B) imipramin kezelés hatására a patkány agyban represszáldott gének listája és ismert funkciói.

A:

A gén neve (mRNS)	Génbanki szám	Funkció	A változás mértéke
ESTs	AA274981	nem ismert	0.50
ESTs	AA267893	nem ismert	0.51

B:

A gén neve (mRNS)	Génbanki szám	Funkció	A változás mértéke
<i>Mus musculus</i> ferritin light chain 1 (Ftl1)	AW536161	vas anyagcsere és stressz fehérje	0.39
<i>Mus musculus</i> translin (Tsn)	AW536161	sejtosztódás és proliferáció	0.50
ESTs	AA268054		0.51
<i>Homo sapiens</i> CGI-108 protein	AW544641	kromatin és transzkripció reguláció	0.51

39. táblázat Az akut (96 óra) (A) és krónikus (4 hét) (B) imipramin kezelés hatására a patkány agyban fokozott mértékben expresszáldott gének listája és ismert funkciói.

A:

A gén neve (mRNS)	Génbanki szám	Funkció	A változás mértéke
ESTs	W18449		1.94
Phosphoglycerate mutase type B subunit	AW536195	anyagcsere	2.02
<i>Mus musculus</i> phosphatidylinositol transfer protein (Pitpn)	AW540942	szignál transzdukció és anyagcsere	2.03
<i>Homo sapiens</i> novel centrosomal protein RanBPM	AW539614	citoszkeleton	2.07
ESTs	AA222181	nem ismert	2.07
<i>Homo sapiens</i> chromosome 17, clone hRPC.1029_K_10	AW544531	nem ismert	2.37
ESTs	AA268054	nem ismert	2.65

B:

A gén neve (mRNS)	Génbanki szám	Funkció	A változás mértéke
Midkine	AA222497	Stressz és repair, anyagcsere	1.63

40. táblázat Az akut (96 óra) citalopram kezelés hatására a patkány agyban represszáldott gének listája és ismert funkciói.

A gén neve (mRNS)	Génbanki szám	Funkció	A változás mértéke
<i>Mus musculus</i> ATPase-like vacuolar proton channel (Atpl)	AW544737	szignál átvitel, anyagcsere	0.32
ESTs	AA239367		0.36
<i>Arabidopsis thaliana</i> chromosome I BAC F20D21 genomic sequence, complete	AW545614		0.30
ATPase-like vacuolar proton channel	AA276030	szignál átvitel, anyagcsere	0.38
<i>Rattus norvegicus</i> proteasomal ATPase (MSS1)	AW545662	metabolizmus	0.32
ESTs, Highly similar to NADH-ubiquinone oxidoreductase B15 subunit (<i>Bos taurus</i>)	AA434897		0.48
ESTs, Weakly similar to ORF YDL015c (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)	AA220458		0.43

ESTs, Weakly similar to T06D8.8 (<i>Caenorhabditis elegans</i>)	W44032		0.34
<i>Mus musculus</i> fibronectin receptor β -chain (VLA5-homolog)	AW544628	sejt adhézió, migráció, differenciáció	0.44
ESTs, Highly similar to NADH-ubiquinone oxidoreductase B15 subunit (<i>Bos taurus</i>)	AA288040		0.47
<i>Rattus norvegicus</i> ubiquitin-like protein	AW545652	metabolizmus	0.46
<i>Mus musculus</i> α -tubulin gene M-alpha-2, 3' end	AW536216	citoszkeleton	0.44
<i>Homo sapiens</i> transcription factor BTF3	AW536271	transzkripció reguláció	0.51

41. táblázat A krónikus (4 hét) citalopram kezelés hatására a patkány agyban represszáldott gének listája és ismert funkciói.

A gén neve (mRNS)	Génbanki szám	Funkció	A változás mértéke
<i>Mus musculus</i> ferritin light chain 1 (Ftl1)	AW536161	sejtszerkezet, anyagcsere	0.38
Malate dehydrogenase, mitochondrial	AA266087	anyagcsere	0.51
<i>Mus musculus</i> clone:2510040L10:homolog to 54TMP	AA244814		0.55
ESTs	AA245155		0.58
ESTs	AA277583		0.56
ESTs	AA268054		0.56
ESTs, Weakly similar to ORF YDL015c (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)	AA220458		0.57
<i>Mus musculus</i> histone H2A.Z	AA466087	transzkripció reguláció	0.58
<i>Homo sapiens</i> poly(A) site DNA	AW544538	transzkripció reguláció	0.59
<i>Mus musculus</i> ATPase-like vacuolar proton channel (Atpl)	AW544737	szignalizáció és anyagcsere	0.63
ESTs	AA273553		0.64
<i>Homo sapiens</i> clone 23783	AW539654		0.62
<i>Rattus norvegicus</i> 14-3-3 protein γ -subtype	AW542425	szignalizáció, anyagcsere, stresszválasz	0.57

42. táblázat Az akut (96 óra) (A) és krónikus (4 hét) (B) citalopram kezelés hatására a patkány agyban fokozott mértékben expresszáldott gének listája és ismert funkciói.

A:

A gén neve (mRNS)	Génbanki szám	Funkció	A változás mértéke
Phosphoglycerate mutase type B subunit	AW536195	metabolizmus	3.20
ESTs	AA268054		3.75
<i>Mus musculus</i> DNA sequence from clone RP23-92G13 on chromosome 13	AA267286		4.57
<i>Homo sapiens</i> poly(A) site DNA	AW544538	transzkripció reguláció	4.47
<i>Mus musculus</i> mSTI1	AW536215	stresszfehérje	6.52

B:

A gén neve (mRNS)	Génbanki szám	Funkció	A változás mértéke
<i>Mus musculus</i> FLI-LRR associated protein-1	W30242		1.81
Midkine	AA222497	stressz-válasz és repair	1.83

A PITP gén expresszióját kétszeresére fokozta az imipramin akut adása. Ennek a génnek a transzkriptumáról tudjuk, hogy szignál-transzdukciós és neuronális differenciálódási folyamatokért felelős (Utsunomiya és mtsai 1997). A fokozott mértékben expresszáldott citoszteletális gének közül a RanBPM emelhető ki. A Ran egy mikrotubulusok összeszereléséért, és nukleális membrán struktúrák kialakításáért felelős proteincsalád egyik tagja (Nakamura és mtsai 1998). A PGAM1, azaz a foszfogliceromutáz gén esetében is fokozott transzkripciót találtunk az imipramin kezelés hatására. Ez az enzim a glikolitikus folyamatokban, azaz a sejtek energiatermelésében játszik szerepet.

A krónikus imipramin kezelés a kromatin regulációs gének működését (transzlin, CGI) represszálta, az NF midkin esetében pedig fokozott transzkripciót okozott. Ez utóbbinak a sejt stresszválaszában és repair folyamatokban tulajdonítanak szerepet (Wada és mtsai 2002).

Eredményeink publikálása óta Tsankova és mtsai (2006) hasonló megfigyelésekről, a depresszióhoz gyakran társuló stressz helyzetek és az imipramin egymással ellentétes irányú kromatin regulációs hatásáról számolt be, amely a hisztonok acilációs mechanizmusán keresztül szabályozza az idegi növekedési faktorok pl. a BDNF transzkripcióját (Hyman 2006). Mind saját eredményeink, mind az említett szerzők legújabb munkái arra utalnak, hogy az imipramin kezelés hosszabb távon a neuronok transzkripciójának regulációja útján is kifejti hatását, és ez a felismerés új kezelési stratégiák kialakításához vezethet a depresszió és az AK terápiájában.

Kísérleteink szerint a citalopram háromszor több gén transzkripciójára hatott, mint az imipramin (40-42. táblázatok). A 3200 vizsgált génből 29 represszáldott, 7 pedig fokozott mértékben expresszáldott. A citalopram esetében is citoszteletális, metabolikus, transzkripciós regulátor, sejthalál és túlélési gének transzkripciója változott meg elsősorban. Ezek közül a legfontosabbakat említve:

- A tubulin fehérje α -alegységének génje represszáldott (40. táblázat). Ez a fehérje számos olyan folyamat résztvevője, amelyet már korábban is kapcsolatba hoztak az antidepresszívumok hatásával pl. G-protein mediált adenilát cikláz reguláció (Rasnick és mtsai 1997), protein foszforiláció (Asakura és mtsai 1996), mikrotubulus összeszerelés (Miyamoto és mtsai 1995).
- A proteoszóma egyik alegységének génje (MSS1) is represszáldott (40. táblázat), mely a degradálódó fehérjék féléletidejének növekedését okozhatja.
- Az ubiquitinhez hasonló fehérjék génjének citalopram indukált repressziója szintén a fehérjék proteolitikus degradációját késleltetheti (40. táblázat).
- A sejthalál és túlélés szempontjából fontos gének közül: a 14-3-3 proteinek, mSTI1 és midkine emelhető ki. Az elsőt represszálta, az utóbbi kettőt pedig indukálta a citalopram kezelés. A midkin esetében mind az imipramin, mind a citalopram hasonló, szignifikáns

expressziót fokozó hatást mutatott (42. táblázat). Ezek az eredményeink is megerősítik az antidepresszívumok neuroproliferatív hatását (Malberg és mtsai 2000).

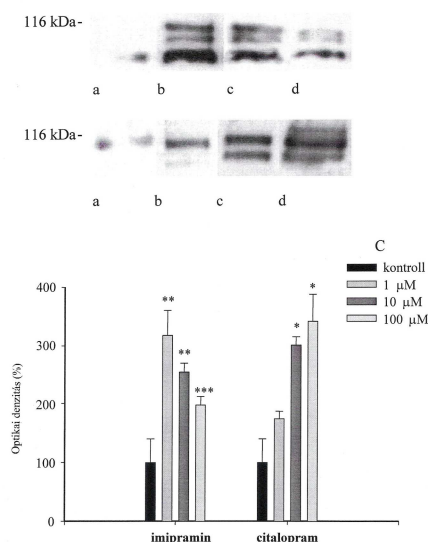
- Az imipraminhoz hasonlóan a citalopram esetében is találtunk hiszton és kromatin működést reguláló hatást (40-42. táblázatok). A citalopram a H2AZ hiszton variáns génjének represszióját okozta (41. táblázat), amely a kromatin struktúrájának szabályozásáért felelős (Cunliffe 2003).
- Mind az akut, mind a krónikus citalopram kezelés represszálta a V-ATP-áz génjének transzkripcióját (40-41. táblázatok). Ennek a génnek a neurotranszmitterek vezikuláris újrafelvételében tulajdonítanak szerepet (Cousin és Robinson 2000; Murata és mtsai 2002) és a citalopram jól ismert tulajdonsága, a szerotonin újrafelvételének gátlása szempontjából lehet fontos.

Összefoglalva, transzkriptomikai kísérleteink új információkat nyújtottak az imipramin és a citalopram molekuláris hatásmechanizmusával kapcsolatosan a KIR-ben (Palotás és mtsai 2004a). Adataink arra utalnak, hogy az antidepresszívumok hatása a KIR-i gének expressziójának regulációjára rendkívül összetett. Szignalizációs, metabolikus, regulációs, sejthalál, és kromatin regulátor gének működésére hatnak. Az elsők között hívtuk fel a figyelmet az antidepresszívumok kromatin regulációs hatására, amely a legújabb kísérletes adatok fényében magyarázhatja a depresszió stressz-elméletét és neuronális patomechanizmusát, továbbá a kromatin regulátor anyagok, mint potenciális új gyógyszerek szerepére hívhatja fel a figyelmet a depresszió és demenciák kezelésében.

3.18. Hogyan befolyásolják az antidepresszív szerek az APP metabolizmusát patkány agyban?

Az előző pontban ismertetett kísérleteink igazolták, hogy a különböző támadáspontú antidepresszívumok a transzkripció szintjén is befolyásolják a neuronok működését (Palotás és mtsai 2004a). Azt azonban nem tudtuk meg, hogy hatással vannak-e az AK patomechanizmusában központi szerepet játszó APP metabolizmusára, azon belül is szekréciójára. Ezért további *in vitro* vizsgálataink célja ennek a kérdésnek a megválaszolása volt (Pákáski és mtsai 2005).

In vitro vizsgálataink elsőként igazolták, hogy mind a triciklikus imipramin, mind az SSRI citalopram több mint háromszorosára növeli a szolubilis APP izoformák szekrécióját bazális előagyi neuronok tenyészetében (14. ábra). A két vizsgált molekulát összehasonlítva az imipramin hatása erősebbnek bizonyult, mint a citalopramé. Hasonló mértékű hatást csak szerotonin vagy muszkarin agonisták közvetlen alkalmazásával mutattak ki korábban (Buxbaum és mtsai 1992; Nitsch és mtsai 1992).

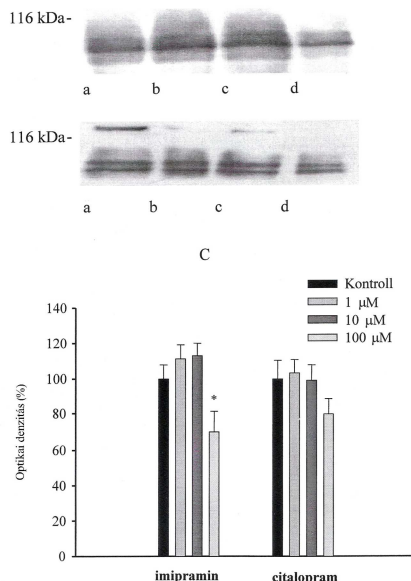


14. ábra Imipramin és citalopram kezelés hatása az APP immunoreaktivitásra patkány bazális előagyi neuron tenyészetekben (E18DIV8), Western immunoblot kísérletek. A reprezentatív immunoblotok az imipramin (az ábra felső sora) és citalopram (az alsó immunoblot sor) különböző dózisainak hatását mutatják be (a: kontroll; b: 1 μ M; c: 10 μ M; d: 100 μ M). Az ábra alsó része, a hisztogram, a szemikvantitatív immunoblot kísérletek eredményeit szemlélteti. A molekulák és dózisaik között kvantitatív különbség az optikai denzitás százalékos egységeiben (három kísérlet eredményeinek átlagai és SD; * $p < 0.01$; ** $p < 0.02$; *** $p < 0.05$).

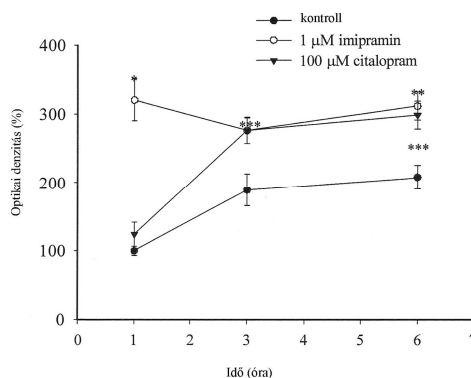
Az AK amiloid hipotézise szerint az APP alternatív splicing-ja két fő irányba történhet, melyek közül csak a béta szekretáz által mediált út az amiloidogén. A sejtek mind amiloidogén, mind nem-amiloidogén APP hasítási termékeket szekretálhatnak. Amennyiben a szekretoros, alfa szekretáz mediált út működik, akkor a nem-amiloidogén peptidek keletkeznek döntően (Esch és mtsai 1990), mivel a BAP szekvencián belül történik a hasítás. A béta szekretáz hasításakor szekretálódnak az aggregációra hajlamos amiloidogén szekvenciák (Haass és Selkoe 1993). A szekretoros APP út az *in vitro* vizsgálatok eredményei szerint arányaiban kevesebb amiloidogén peptidet eredményez és ezért az AK szempontjából kedvezőbbnek minősíthető, mivel kevesebb ligand áll a béta szekretáz rendelkezésére a membránban (Gabuzda és mtsai 1993). Ezért minden olyan terápiás beavatkozás, amely fokozza az APP szekrécióját, csökkentheti az amiloid depozitumok kialakulásának lehetőségét, ezért hatékony új AK kezelési stratégia kiindulópontja lehet.

Amennyiben a szekretoros APP metabolikus út folyik nagyobb mértékben, akkor feltételezhető, hogy csökken az APP molekulák mennyisége a tenyésztett sejtek membránjaiban. Nem meglepő tehát, hogy az imipramin esetében az elvárásoknak megfelelően csökkent celluláris APP szinteket figyeltünk meg, a citalopram esetében azonban nem volt kimutatható ilyen jellegű változás. Ennek ellenére, mivel a szekretált izoformák mennyiségét mindkét vizsgált molekula idő függően növeli (15-16. ábrák), az AK amiloidogén patomechanizmusa szempontjából mindkét antidepresszívum kedvező terápiás hatású lehet. Figyelemre méltó azonban, hogy míg az imipramin esetében inverz koncentráció-függés volt megfigyelhető a

szekretált APP formák mennyiségében, addig a citalopramnál lineáris összefüggést találtunk (16. ábra).



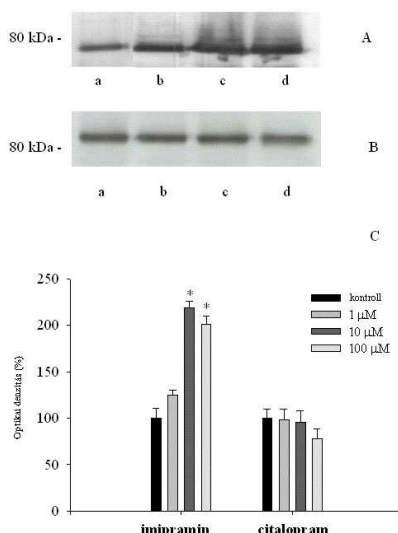
15. ábra Imipramin és citalopram kezelés hatása a szekretált APP izoformák mennyiségére patkány bazális előagyi neuron tenyészetek (E18DIV8) tápfolyadékában, Western immunoblot kísérletek. A reprezentatív immunoblottok az imipramin (az ábra felső sora) és citalopram (az alsó immunoblot sor) különböző dózisainak hatását mutatják be (a: kontroll; b: 1 μM; c: 10 μM; d: 100 μM). Az ábra alsó része, a hisztogram, a szemi kvantitatív immunoblot kísérletek eredményeit szemlélteti. A molekulák és dózisaik közötti kvantitatív különbség az optikai densitás százalékos egységeiben (három kísérlet eredményeinek átlagai és SD; * $p < 0.05$).



16. ábra Imipramin és citalopram kezelés hatása a szekretált APP izoformák mennyiségére az idő függvényében. Patkány bazális előagyi neuron tenyészetek (E18DIV8) tápfolyadékában, Western immunoblot kísérletek. A molekulák és dózisaik közötti kvantitatív különbség az optikai densitás százalékos egységeiben (három kísérlet eredményeinek átlagai és SD; * $p < 0.002$; ** $p < 0.02$; *** $p < 0.05$).

A PKC a biogén aminosavak szubcelluláris hatásának egyik mediátora, és az antidepresszívumok hatásának egyik közvetítője (Mann és mtsai 1995). Kísérleteinkben a PKC mennyiségét eltérően befolyásolta a két antidepresszívum a kezelt sejtekben (17. ábra). Míg az imipramin kezelés fokozta az enzim mennyiségét, addig a citalopram esetében nem találtunk változásokat. Adataink megerősítik Morishita és Aoki (2002) megfigyeléseit, akik trombocitákban találtak hasonló eltéréseket imipramin kezelést követően. Eredményeink szerint az imipramin hatásától eltérően a citalopram kezelés nem befolyásolja a PKC neuronális

mennyiségét, és ez arra utal, hogy a különböző típusú antidepresszívumok hatása eltérő a PKC vonatkozásában. Mivel a két általunk vizsgált molekula PKC mennyiségre irányuló hatása eltért, ugyanakkor APP szekrécióra irányuló hatásuk megegyezett, feltételezhetjük, hogy eltérő hatásmechanizmussal fokozzák az APP szekrécióját. Kísérleteink azonban nem adnak választ arra, hogy ez a folyamat hogyan történik.



17. ábra Imipramin és citalopram kezelés hatása a PKC immunoreaktivitásra patkány bazális előagyi neuron tenyészetekben (E18DIV8), Western immunoblot kísérletek. A reprezentatív immunoblottok az imipramin (az ábra felső sora) és citalopram (az alsó immunoblot sor) különböző dózisainak hatását mutatják be (a: KT; b: 1 µM; c: 10 µM; d: 100 µM). Az ábra alsó része, a hisztogram, a szemikvantitatív immunoblot kísérletek eredményeit szemlélteti. A molekulák és dózisaik közötti kvantitatív különbség az optikai denzitás százalékos egységeiben (három kísérlet eredményeinek átlagai és SD; * $p < 0.05$).

Az általunk vizsgált két antidepresszívum neurotranszmitterek szintjén ismert hatásmechanizmusa is eltérő jellegű (Veenstra-VanderWeele és mtsai 2000). Az imipramin krónikus kezelésekben döntően a noradrenalin újrafelvételét gátolja, a szerotonint kevésbé, és alkalmazása során következményes 5-HT_{2c} receptor down-regulációt figyeltek meg (Eison és mtsai 1991). A szerotonin receptorok aktivitásának csökkenése révén az imipramin esetében az APP szekréció csökkentését várnánk, de eredményeink markáns szekréció fokozódást igazoltak, tehát más mechanizmusok is szerepet játszhatnak a folyamat szabályozásában.

Már az előző, pontban ismertetett, az imipramin és citalopram transzkriptomikai hatását vizsgáló kísérleteink eredményei is arra utalnak, hogy az antidepresszívumok hatása rendkívül összetett, a neurotranszmitterek szintje mellett genomikus szabályozási folyamatokat is érinthet (Veenstra-VanderWeele és mtsai 2000). Ezért további kísérletek szükségesek az APP metabolizmusra kifejtett hatásaik pontos megértéséhez.

Összefoglalva, a triciklikus antidepresszívumok közé tartozó imipramin és az SSRI citalopram kedvező, az APP szekréciót fokozó hatását mutattuk ki *in vitro* szövettenyészetes kísérleti rendszerünkben (Pákáski és mtsai 2005). Adataink szerint a két molekula eltérően hat a celluláris PKC szintekre, az imipramin emeli, a citalopram kezelés pedig nem változtatja meg.

Eredményeink a triciklikus antidepresszívumok és az SSRI-ok kedvező terápiás hatását valószínűsítik AK-ban, de feltételezhetően eltérő hatásmechanizmus révén.

3.19. Hogyan hat a szelektív szerotonin újrafelvétel gátló citalopram és a kombinált noradrenerg és szerotoninerger hatású mirtazapin AK-os betegek limfocitáinak génexpressziójára?

Korábbi vizsgálatainkban az AK-os betegek limfocitáinak génexpressziós profil jellemzése után (Kálmán és mtsai 2005b) a triciklikus és az SSRI típusú antidepresszívumok genomikus hatását térképeztük fel patkányok kortexében (Palotás és mtsai 2004a). Megállapítottuk, hogy a vizsgált molekulák elsősorban a neuronális szignalizációs folyamatokban, plaszticitásban, metabolikus funkciókban, sejthalálban és túlélésben felelős gének transzkripcióját módosítják. Ugyanezt a gondolatmenetet folytatva, a továbbiakban arra voltunk kíváncsiak, hogy a noradrenerg és szerotoninerger hatású antidepresszívumok milyen specifikus transzkripciós változásokat indukálnak AK betegek limfocitáiban (Palotás és mtsai 2004b). Kísérleteinkben 3200 génen követtük a citalopram és a mirtazapin 4 hetes szedésének hatását AK-os betegeken. Eredményeinket a 43-45. táblázatok mutatják be a citalopram, és a 46-47. táblázatok a mirtazapin esetében.

Az alacsony szerotoninerger aktivitás nem csak a depresszió sajátossága, hanem az AK-os betegek agyában is kimutatható (Bowen és mtsai 1983). Az AK-os betegek limfocitái pedig saját és mások vizsgálatai szerint is számos specifikus eltérés hordozói, metabolikus, immun és szignalizációs funkcionális zavarokat okozva a sejtek működésében (Eckert és mtsai 1998; Etcheberrigaray és Bhagavan 1999; Mórocz és mtsai 2002; Zana és mtsai 2005).

43. táblázat. A citalopram kezelés hatására fokozott mértékben expresszáldott gének a KT személyek limfocitáiban.

A klón neve (mRNS)	Génbanki szám	A változás mértéke
DNA G/T mismatch-binding protein	U73737	3
Retinoblastoma-binding protein 1 (alternative products)	S66427	3.24
Human mRNA for KIAA0118 gene, partial cds	D42087	3.28
EST	AA768866	3.29
EST	AA424932	3.3
<i>Homo sapiens</i> KIAA0421 mRNA, partial cds	AB007881	3.54
TIA1 cytotoxic granule-associated RNA-binding protein-like 1	D64015	3.63
<i>Homo sapiens</i> KIAA0414 mRNA, partial cds	AB007874	3.74
EST	AA034298	3.79
Eukaryotic translation initiation factor 3 (eIF-3) p36 subunit	U39067	3.83
Spectrin- α , non-erythrocytic 1 (α -fodrin)	J05243	3.83
Defender against cell death 1	D15057	3.89
<i>Homo sapiens</i> FRG1 mRNA, complete cds	L76159	3.9
Core-binding factor, β -subunit	L20298	4.17
<i>Homo sapiens</i> similar to 60S ribosomal	XM046136.1	4.42

protein L30 isolog (LOC123334), mRNA		
ESTs, Highly similar to KIAA0187 (<i>H. sapiens</i>)	AA203278	5.63
Human glioma pathogenesis-related protein (GliPR) mRNA, complete cds	U16307	5.75
Human mRNA for KIAA0137 gene, complete cds	D50927	6.52

A négy hetes citalopram kezelés a 3200 vizsgált gén 1.2%-ában, azaz 39 esetben okozott transzkripció változásokat az AK-os személyeknél (44-47. táblázatok). A KT személyek génjei közül összesen 19 esetben találtunk fokozott expressziót, míg szignifikáns represszív hatást egyik gén esetében sem fordult elő (43. táblázat).

A citalopram szedése mind a KT, mind az AK személyeknél néhány citoprotektív és anti-apoptotikus folyamatokban részt vevő gén transzkripcióját fokozta. Ide tartoznak: a defender against cell death 1, mismatch-binding protein, citotoxic granule-associated RNA-binding protein-1 génjei. Ez utóbbi fokozott kifejeződése mindkét vizsgált csoportban kimutatható volt (43-44. táblázatok).

A citoskeletális fehérjék génjei közül az α -fodrin fokozott transzkripcióját figyeltük meg a citalopram kezelés hatására, de ez a hatás szelektíven csak a KT csoportot érintette. Az α -fodrinról ismert, hogy az apoptózisban szereplő kaszpáz-3 enzim egyik célmolekulája, és az NFF-ban a tau proteinnel együtt fordul elő az AK-os betegek agyában. Az α -fodrin gén szelektív citalopram válaszkészsége összhangban áll korábbi saját (Kálmán és mtsai 2005b) és mások megfigyeléseivel arra vonatkozóan, hogy a citoskeletális és sejt adhéziós molekulák közül több csökkent mértékben expresszálódik és diszfunkcionális az AK-os betegek limfocitáiban ill. fibroblasztjaiban (Takeda és mtsai 1992).

44. táblázat A citalopram kezelés hatására fokozott mértékben expresszálódott gének az AK személyek limfocitáiban.

A klón neve (mRNS)	Génbanki szám	A változás mértéke (átlag)
Gonadotropin-releasing hormone (luteinizing-hormone releasing hormone)	X01059	2.05
Major histocompatibility complex enhancer-binding protein MAD3	M69043	2.08
<i>Homo sapiens</i> KIAA0414 mRNA, partial cds	AB007874	2.10
Solute carrier family 5 (sodium/glucose cotransporter), member 1	L29339	2.11
Human mRNA for KIAA0118 gene, partial cds	D42087	2.11
EST	AA044813	2.13
<i>Homo sapiens</i> clone 24723 mRNA sequence	AF055023	2.17
ESTs, Weakly similar to zinc-finger protein 85 (<i>Homo sapiens</i>)	N30728	2.20
MYB proto-oncogene protein	U22376	2.21
Utrophin	X69086	2.22
MAX protein	X60287	2.22

Human ser-thr protein kinase PK428 mRNA, complete cds	U59305	2.26
Human Krueppel-related zinc-finger protein (H-plk) mRNA, complete cds	M55422	2.29
Core-binding factor, β -subunit	L20298	2.30
EST	H73202	2.33
Human mRNA for KIAA0137 gene, complete cds	D50927	2.37
EST	AA583145	2.39
EST	R98130	2.58
Myeloid cell nuclear differentiation antigen	M81750	2.59
Platelet factor 4	M25897	2.67
Human ras inhibitor mRNA, 3'-end	M37190	2.72
TIA1 cytotoxic granule-associated RNA-binding protein-like 1	D64015	2.89
Sodium channel, voltage-gated, type I, β -polypeptide	L10338	3.06
<i>Homo sapiens</i> ribosomal protein S11, clone MGC:27330 IMAGE:4667201,mRNA, complete cds	BC016378	3.10

Már korábbi saját és mások vizsgálati eredményei (*Palotás és mtsai 2004a,b*; Tsankova és mtsai 2006) felhívták a figyelmet arra, hogy a triciklikus és az SSRI típusú antidepresszívumok transzkripció és kromatin reguláló hatásokkal is rendelkeznek (Veenstra-VanderWeele és mtsai 2000). Ezt erősíti meg jelenlegi megfigyeléseink közül az a tény, hogy a citalopram kezelés mind az AK, mind a KT csoportokban fokozta egy transzkripciós faktor, a core binding factor átíródását, amely többek között a citoszkeletális és mátrix proteinek génjeinek működését is szabályozza.

Korábbi, limfocitákon végzett génexpressziós vizsgálatunk eredményei szerint számos, immunfunkciókhoz kapcsolható gén represszáldott az AK-os betegekben (*Kálmán és mtsai 2005b*). Jelenlegi kísérletünk eredményei szerint a citalopram kezelés nem hatott ezeknek a géneknek a kifejeződésére, számos más, szintén az immunfunkciókhoz kapcsolódó gén működését megváltoztatta azonban (*Palotás és mtsai 2004b*). Ide tartozik pl. a platelet factor-4, myeloid cell nuclear differentiation antigen, MHC enhancer binding protein, core binding factor. A citalopram immunfunkciókhoz kapcsolható géneket moduláló hatása közvetlenül összefügghet a molekula 5HT szintet emelő hatásával, hiszen az 5HT receptorok jelen vannak az immunsejteken, így a limfocitákon is (Mossner és Lesch 1998; Stefulj és mtsai 2000).

45. táblázat A citalopram kezelés hatására represszáldott gének az AK személyek limfocitáiban.

A klón neve (mRNS)	Génbanki szám	A változás mértéke
Fibronectin 1	X02761	0.10
<i>Homo sapiens</i> eukaryotic translation elongation factor-1 α	BC018641.1	0.13
EST	AA233054	0.14

Human mRNA for KIAA0137 gene, complete cds	D50927	0.15
Human putative mono-ADP-ribosyltransferase (htMART) mRNA, complete cds	U47054	0.17
Proliferation-associated gene A (natural killer-enhancing factor A)	X67951	0.17
EST	AA258550	0.21
Adenine nucleotide translocator 2 (fibroblast)	J02683	0.21
CDC28 protein kinase 2	X54942	0.22
<i>Homo sapiens</i> ribosomal protein L10 (RPL10), mRNA	XM 048415.1	0.22
<i>Homo sapiens</i> similar to 60S ribosomal protein L30 isolog (LOC123334), mRNA	XM 046136.1	0.25
<i>Homo sapiens</i> similar to ribosomal protein L10; QM gene; DNA segment	XM 048417.1	0.28
<i>Homo sapiens</i> similar to 60S ribosomal protein L10 (QM protein homolog) (LOC90571), mRNA	XM 032658.1	0.29
<i>Homo sapiens</i> lectin, galactoside-binding, soluble, 1 (galectin-1)(LGALS1), mRNA	XM 038717.1	0.29
Immunoglobulin- μ	X58529	0.30

Az imipramin az elsőként használt triciklikus antidepresszívum molekula, kevert noradrenerg és szerotoninerget hatásokkal, és a pszichofarmakológiai vizsgálatokban általánosan elfogadott referencia szerként szerepel. Korábbi génexpressziós profil és APP metabolizmust vizsgáló kísérleteinkben ezért is használtuk elsődlegesen. Az 1950-es években történt bevezetése óta számos új hatásmechanizmusú, kedvezőbb mellékhatás profilú hangulatjavító szer került a klinikai használatba. Ezek közül a mai napig legtöbbet használt csoportot, az SSRI készítményeket az 1970-es évek közepén hozták forgalomba. Az SSRI-k és az azóta bevezetésre került még újabb generációs vegyületek génexpressziós és AK specifikus hatásairól vizsgálataink publikációjáig, az imipraminhoz hasonlóan nem rendelkezünk információkkal.

A mirtazapint 2000-ben törzskönyvezték Magyarországon a depresszió kezelésére, és az imipraminhoz hasonlóan noradrenerg és szelektív szerotoninerget (NaSSA) hatással rendelkezik, de a hisztamin H_1 receptorokat is blokkolja. A molekula noradrenerg hatásai közül a preszinaptikus α_2 auto- és hetero- (5HT neuronok) receptorainak blokádját a legkifejezettebb, szerotoninerget hatása pedig az 5HT₂ és 5HT₃ receptorok gátlásán keresztül érvényesül. Korábbi kísérletünkben az α_{2c} receptorok génjének represszióját figyeltük meg az AK-os betegek limfocitáiban (Kálmán és mtsai 2005b). Ezért végeztünk kísérleteket a továbbiakban arra vonatkozóan, hogy az α_2 -adrenoreceptor hatással rendelkező mirtazapin hogyan befolyásolja az AK-os betegek limfocitáinak génexpressziós mintázatát (Palotás és mtsai 2004c). Eredményeinket a 46-47. táblázatok foglalják össze.

46. táblázat A mirtazapin kezelés hatására megváltozott mértékben expresszáldott gének listája a KT személyek limfocitáiban.

A klón neve (mRNS)	Génbanki szám	A változás mértéke
Human G0S3 mRNA, complete cds	L49169	0.26
Human scaffold protein Pbp1 mRNA, complete cds	AF000652	0.30
<i>Homo sapiens</i> bet3 (BET3) mRNA, complete cds	AF041432	0.34
Epidermal growth factor	X04571	0.35
Formyl peptide receptor-like 2	D10922	0.42
Ubiquitin-conjugating enzyme E2B (RAD6 homologue)	M74525	0.43
<i>H. sapiens</i> pyrin (MEFV) mRNA, complete cds	AF018080	0.43
Tumor necrosis factor-inducible protein tsg-6 precursor	M31165	0.43
Zinc finger protein 2 (A1-5)	X78925	0.44
Image EST	R78712	0.45
Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase, mitochondrial precursor	M80254	0.46
Human mRNA for KIAA0227 gene, partial cds	D86980	2.19
CD3G antigen, gamma polypeptide (TiT3 complex)	X04145	2.19
Proliferation-associated gene A (natural killer-enhancing factor A)	X67951	2.20
T-cell receptor, beta cluster	K01571	2.28
Mannose phosphate isomerase	X76057	2.34
60S ribosomal protein L41	Z12962	2.41
Human ring zinc-finger protein (ZNF127-Xp) gene and 5' flanking sequence	U41315	2.63
Finkel-Biskis-Reilly murine sarcoma virus (FBR-MuSV) ubiquitously expressed (fox derived)	X65923	2.63
Human mRNA for NADPH-flavin reductase, complete cds	D32143	2.87

A DNS lapka technikával vizsgált 3200 gén közül 46 gén (1.4%) esetében találtunk a mirtazapin kezelés után transzkripció változást (46-47. táblázatok). A KT személyeknél 9/11, az AK-os betegeknek pedig 7/17 volt a represszált és indukált gének aránya az egyes csoportokban.

Eredményeink szerint egyetlen noradrenerg vagy szerotoninerg rendszerrel kapcsolatos gén esetében sem találtunk szignifikáns transzkripció változást a mirtazapin kezelést követően, hasonlóan korábbi kísérleteinkhez, amelyekben az imipramin és citalopram hatásait vizsgáltuk (Palotás és mtsai 2004a,b). Ez a megfigyelésünk arra utal, hogy az antidepresszív hatású pszichofarmakonok hatása kifejezettebb a limfociták nem noradrenerg és szerotoninerg funkciókkal kapcsolatos genetikai állományára, mint a monoamin rendszerekkel kapcsolt génekre.

47. táblázat A mirtazapin kezelés hatására megváltozott mértékben expresszáldott gének listája a KT személyek limfocitáiban.

A klón neve (mRNS)	Génbanki szám	A változás mértéke (átlag)
<i>H. sapiens</i> defensin 5 gene, complete cds	M97925	1.11
Human cell death protein (<i>rip</i>) mRNA, partial cds	U50062	0.76
Tumor necrosis factor-inducible protein TSG-6 precursor	M31165	0.78
Carbonic anhydrase II	J03037	0.86
Putative DNA-binding protein A20	M59465	1.27
<i>H. sapiens</i> stimulator of Fe-transport mRNA, complete cds	AF020761	0.73
α_{2C-1} adrenoceptor	J03853	1.06
Human retinoic acid-responsive protein (NN8-4AG)	U50383	0.94
Human mRNA for KIAA0059 gene, complete cds	D31883	2.53
<i>H. sapiens</i> HP protein (HP) mRNA, complete cds	AF035119	1.06
Human BAC clone GS025M02 from 7q21-q22	AC002540	1.02
<i>H. sapiens</i> mRNA for villin-like protein, complete cds	D88154	1.03
EST	AA610122	1.09
Cysteine-rich protein	M33146	1.09
Bone morphogenetic protein 4	M22490	1.09
<i>H. sapiens</i> atrophin-1 interacting protein 4 (AIP4) mRNA, partial cds	AF038564	0.94
EST	AA938448	1.07
<i>H. sapiens</i> torsinB (DQ1) mRNA, partial cds	AF007872	1.01
EST	AA918616	0.92
Homologue of <i>Drosophila</i> slowpoke (potassium channel)	U13913	1.02
<i>H. sapiens</i> mitotic feedback control protein Madp2 homologue mRNA	U65410	1.10
EST	AA845426	1.10
Glucosaminyl (N-acetyl) transferase 1, core 2	M9734h7	1.03
EST	AA648525	1.22
<i>H. sapiens</i> putative tumor suppressor protein unspliced form (Fus-2)	AF040705	0.92
EST	AA886792	1.12

A mirtazapin kezelést követően a legnagyobb változásokat a limfociták immunfunkcióival kapcsolatos génjei esetében találtuk. Ezek közül a KT személyek esetében a natural killer-enhancing factor A, CD3G antigén emelhető ki (43. táblázat). Számos apoptózis és metabolikus hatású gén esetében találtunk repressziót a KT csoportban. Ez utóbbiak változásait magyarázhatja a mirtazapin perifériás szerotoninergerg és noradrenerg receptorokra kifejtett hatása, hiszen a limfociták rendelkeznek ilyen típusú receptorokkal (Ferriere és mtsai 1996), továbbá a limfoid szervek noradrenerg és szerotoninergerg beidegzéseket is kapnak (Bellinger és mtsai 1988) és a biogén aminok a limfociták működését közvetlenül is befolyásolják (Aune és mtsai 1990).

A mirtazapin nem csak a szerotoninergerg, hanem a noradrenerg rendszeren keresztül is

kifejtheti direkt, vagy indirekt módon limfocita immun-moduláló és génexpressziót módosító hatását, hiszen a T-sejteken található α_2 -adrenoreceptorok stimulálásáról kimutatták, hogy csökkenti a sejtek reaktivitását (Felsner és mtsai 1995). Az α -receptorok serkentése továbbá csökkenti minden fajta limfocita alcsoport esetében a sejtek számát az NK sejtek kivételével (Stevenson és mtsai 2001). Az NK sejtek katekolamin válasza eltér a többi limfocitáétól, hiszen ezek a sejtek α_1 és β_2 receptoraik számának csökkentésével reagálnak az agonista hatásra, míg a T sejtek α_2 receptoraik számát növelik meg (Jetschmann és mtsai 1996). Saját megfigyeléseink szerint a mirtazapin eltérő irányban hat az olyan NK és T-sejtek funkcióihoz kapcsolható gének expressziójára, mint pl. a natural-killer enhancing factor A, a CD3G antigén, stb. (46-47. táblázatok).

Mivel az immunrendszer szerepét feltételezik mind a hangulatzavarok, mind az AK kialakításában (a depresszió stressz-mediált neuroendokrin-neurodegeneratív hipotézise), ezért a mirtazapinnal, és korábban az imipraminnal és citaloprammal kapcsolatos hasonló eredményeink – azaz hogy ezek a molekulák az immunfunkciókhoz kapcsolt gének expresszióját modulálják a limfocitákban – fontosak lehetnek mind az affektív betegségek, mind az AK terápiája és immun-patomechanizmusának megértése szempontjából.

Összefoglalva, az SSRI csoportba tartozó citaloprammal kezelve AK-os betegeket, a citoskeletális, immun, sejthalál és túléléssel kapcsolatos gének transzkripciója változott meg. Elsőként bizonyítottuk, hogy mind a citalopram, mind a mirtazapin genomikus hatása elsődlegesen az immunfunkciókat reguláló gének transzkripciójának módosításában nyilvánul meg mind a KT, mind az AK-os személyek limfocitáiban (Palotás és mtsai 2004a,b). Eredményeink megerősítik a korábbi állatkísérletes és humán adatainkat a hangulatjavítók genomikus hatásait illetően, és felhívják a figyelmet az SSRI és az NaSSA-hatású antidepresszív kezelés potenciális előnyeire az immunfolyamatok és az AK vonatkozásában. Kísérleteink transzkriptomikai szinten nyújtottak továbbá újabb adatokat az immun és idegrendszeri folyamatok, valamint az antidepresszívumok kölcsönhatásainak megértéséhez.

3.20. Hogyan befolyásolja a kevert noradrenerg és szerotoninerg hatású venlafaxin antidepresszívum kezelés az idős, pseudodemens személyek limfocitáinak génexpressziós mintázatát?

A venlafaxin az SSRI-ok után megjelenő harmadik generációs, SNRI típusú antidepresszív hatású molekula, amely hatását a szerotonin, noradrenalin és kisebb mértékben a dopamin újrafelvételének gátlásán keresztül fejti ki (Muth és mtsai 1986). Hangulatjavító hatását tekintve nem hatékonyabb, mint az imipramin, vagy a többi ismert molekula, de kardiovaszkuláris és más jellegű mellékhatásprofilja lényegesen kedvezőbb (Pacher és Kecskeméti 2004). Ez utóbbi különösen az idős depressziós és a depressziós és demens

komorbid betegek szempontjából fontos, hiszen a kardio- és cerebrovaszkuláris betegségek rizikója az életkorral nő. Kísérleteink következő szakaszában arra voltunk kíváncsiak, hogy ez a három neurotranszmitter rendszerre is ható molekula hogyan módosítja idős depressziós személyek limfocitáinak génexpressziós mintázatát (Kálmán és mtsai 2005c). A korábban alkalmazott kísérletes protokolljainktól annyiban térünk el, hogy a vizsgálati személyek idős, nem demens, depressziós betegek voltak, a vizsgálat pedig önkontrollos volt. Eredményeinket a 48-49. táblázatok foglalják össze.

48. táblázat A venlafaxin kezelés hatására indukált gének listája. A másfélszeresnél nagyobb változások félkövér betűtípussal jelöltek.

A klón neve (mRNS)	Génbanki szám	Funkció	A változás mértéke
<i>Homo sapiens</i> stress-induced-phosphoprotein 1 (Hsp70/Hsp90-organizing protein) (STIP1),	NM 006819	stressz-válasz	0.81
<i>Homo sapiens</i> aristaless homeobox (Drosophila) (ARIX), mRNA	NM 005169	DNS transzkripció reguláció	0.87
<i>Homo sapiens</i> ureidopropionase- β (UPB1), mRNA	NM 016327	nitrogén metabolizmus	0.89
<i>Homo sapiens</i> cDNA FLJ12643 fis, clone NT2RM4001969, moderately similar to <i>Rattus norvegicus</i> mRNA for IP63 protein	AK022705	citoszkeleton	0.93
<i>Homo sapiens</i> mRNA for ribosomal protein S12, partial cds	D28378	ismeretlen	0.95
<i>Homo sapiens</i> prion gene complex, downstream (PRND), mRNA	NM 012409	ismeretlen	0.96
<i>Homo sapiens</i> ADP-ribosyltransferase (NAD ⁺ ; poly (ADP-ribose) polymerase)-like 1 (ADPRTL1), mRNA	NM 006437	DNS javítás	0.99
<i>Homo sapiens</i> cDNA: FLJ20892 fis, clone ADKA03430	AK024545	ismeretlen	1.00
<i>Homo sapiens</i> ribonuclease/angiogenin inhibitor (RNH), mRNA	NM_002939	RNS anyagcsere	1.04
<i>Homo sapiens</i> mRNA for KIAA0869 protein, partial cds	AB020676	citoszkeleton	1.13
<i>Homo sapiens</i> hemoglobin, θ_1 (HBQ1), mRNA	NM 005331	oxigén szállítás	1.20
<i>Homo sapiens</i> fragile X mental retardation 1 (FMR1), mRNA	NM 002024	egyedfejlődés	1.20
<i>Homo sapiens</i> hypothetical protein LOC51059 (LOC51059), mRNA	NM 015912	egyedfejlődés	1.25
<i>Homo sapiens</i> cDNA: FLJ22332 fis, clone HRC05753	AK025985	DNS transzkripció	1.29
<i>Homo sapiens</i> nudix (nucleoside diphosphate linked moiety X)-type motif 1 (NUDT1), mRNA	NM 002452	DNS javítás	1.30
<i>Homo sapiens</i> hematopoietic protein 1 (HEM1), mRNA	NM 005337	hematopoézis	1.31
<i>Homo sapiens</i> cDNA: FLJ23064 fis, clone LNG04783, highly similar to AF015283 <i>Homo sapiens</i> selenoprotein W (hSelW) mRNA	AK026717	spermatogenezis	1.34

<i>Homo sapiens</i> mRNA; cDNA KFZp564H0616 (from clone DKFZp564H0616)	AL110175	ismeretlen	1.34
<i>Homo sapiens</i> Mix.1 homeobox-like protein (MIXL) mRNA, complete cds	AF211891	transzkripció reguláció	1.35
<i>Homo sapiens</i> betaine-homocysteine methyltransferase (BHMT), mRNA	NM 001713	metionin bioszintézis	1.40
<i>Homo sapiens</i> lipase, endothelial (LIPG), mRNA	NM 006033	lipid metabolizmus	1.57
<i>Homo sapiens</i> synaptotagmin IV mRNA, complete cds	AF299075	neurotranszmisszió	1.59
<i>Homo sapiens</i> ring finger protein 1 (RING1), mRNA	NM 002931	kromatin szerkezet	1.68
<i>Homo sapiens</i> chromosome 1 unknown protein mRNA, partial cds	U67037	komplement aktiváció	1.71
<i>Homo sapiens</i> mRNA; cDNA DKFZp434O1230	AL137489	ismeretlen funkció	2.11
<i>Homo sapiens</i> C17orf1 gene, exon 8 3'	AJ008128	citokinézis	2.11
<i>Homo sapiens</i> sal-like 1 (<i>Drosophila melanogaster</i>) (SALL1), mRNA	NM 002968	embriogenezis és morfogenezis	2.12
<i>Homo sapiens</i> cDNA: FLJ20896 fis, clone ADKA03527	AK024549	szignál transzdukció	2.16
RCC1=RCC1-I {alternatively spliced, exon 6', insertion site}	S75708	mitosis	2.21
<i>Homo sapiens</i> clone FLB7527 PRO1999 mRNA, complete cds	AF113699	spermatogenezis	2.22
<i>Homo sapiens</i> cDNA FLJ11795 fis, clone HEMBA1006155	AK021857	ismeretlen funkció	2.50

A biogén amin típusú neurotranszmitterek, a noradrenalin, szerotonin és a dopamin a hangulati-érzelmi élet, a kognitív működések, az addikció, alvás, étvágy, szexuális viselkedés, immunfunkciók és sok más olyan működés szabályozásában vesznek részt, amely a demencia és depresszió szindrómák igen fontos klinikai komponense (Felten és mtsai 1987; Ader 1991; Meredith és mtsai 2005).

49. táblázat A venlafaxin kezelés hatására represszált gének listája. A másfélszeresnél nagyobb változások félkövér betűtípussal jelöltek.

A klón neve (mRNS)	Génbanki szám	Funkció	A változás mértéke
<i>Homo sapiens</i> putative tumor suppressor mRNA	AF156166	ismeretlen funkció	-4.28
<i>Homo sapiens</i> cDNA FLJ14017 fis, clone HEMBA1000505	AK024079	protein komplexumok	-3.97
<i>Homo sapiens</i> ret finger protein 2 (RFP2), transcript variant 1, mRNA	NM 005798	embriogenezis, morfogenezis	-3.40
<i>Homo sapiens</i> hypothetical protein FLJ20303 (FLJ20303), mRNA	NM 017755	transzkripció reguláció	-3.15
<i>Homo sapiens</i> LIM domain only 7 (LMO7), transcript variant 1, mRNA	NM 005358	protein anyagcsere	-3.03
<i>Homo sapiens</i> acid phosphatase 5, tartrate resistant (ACP5), mRNA	NM 001611	szfingolipid anyagcsere	-2.85
<i>Homo sapiens</i> major vault protein (MVP), transcript variant 1, mRNA	NM 017458	metabolizmus	-2.56

<i>Homo sapiens</i> like-glycosyltransferase (LARGE), transcript variant 1, mRNA	NM 004737	N-acetil-glükózamin metabolizmus	-2.34
<i>Homo sapiens</i> HSPC052 protein (HSPC052), mRNA	NM 014150	RNS processzng	-1.98
<i>Homo sapiens</i> cDNA FLJ13310 fis, clone OVARC1001453	AK023372	ismeretlen funkció	-1.78
<i>Homo sapiens</i> transcription factor 12 (HTF4, helix-loop-helix transcription factors 4) (TCF12), mRNA	NM 003205	transzkripció reguláció	-1.68
<i>Homo sapiens</i> kallikrein 10 (KLK10), transcript variant 1, mRNA	NM 002776	proteolízis	-1.68
<i>Homo sapiens</i> NICE-5 protein (HSA243666),mRNA	NM 017582	proteolízis	-1.57
<i>Homo sapiens</i> voltage-dependent anion channel 2 (VDAC2), mRNA	NM 003375	anion transzport	-1.35
<i>Homo sapiens</i> retinoblastoma binding protein 2 (RBBP2), mRNA	NM 005056	transzkripció reguláció	-1.34
Human rap2 mRNA for ras-related protein	X12534	szignál transzdukció	-1.31
<i>Homo sapiens</i> mRNA for KIAA1151 protein, partial cds	AB032977	citoszkeleton	-1.31
<i>Homo sapiens</i> polymerase (DNA-directed), ε4 (p12 subunit) (POLE4), mRNA	NM 019896	ismeretlen funkció	-1.22
<i>Homo sapiens</i> purinergic receptor P2X, ligand-gated ion channel, 1 (P2RX1), mRNA	NM 002558	iontranszport	-1.18
<i>Homo sapiens</i> mRNA; cDNA DKFZp434B2119 (from clone DKFZp434B2119); partial cds	AL137529	lipid anyagsere	-1.13
<i>Homo sapiens</i> cDNA: FLJ20980 fis, clone ADSU01986	AK024633	transzkripció reguláció	-1.10
<i>Homo sapiens</i> GTP-binding protein sara (LOC51128), mRNA	NM 016103	intracelluláris protein	-0.96
<i>Homo sapiens</i> polymerase (DNA directed), δ2, regulatory subunit 50kDa (POLD2), mRNA	NM 006230	DNS replikáció	-0.92
<i>Homo sapiens</i> allograft inflammatory factor 1 (AIF1), transcript variant 2, mRNA	NM 004847	gyulladás	-0.91
<i>Homo sapiens</i> cDNA: FLJ21932 fis, clone HEP04318	AK025585	RNS metabolizmus	-0.87
<i>Homo sapiens</i> carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 3 (CEACAM3), mRNA	NM 001815	immunválasz	-0.79

Elsőként számoltunk be az irodalomban a venlafaxin transzkriptom szintű hatásairól idős depressziós betegek limfocitáiban (Kálmán és mtsai 2005c). A négyhetes SNRI kezelés hatására a 8 000 vizsgált gén 0.71%-ánál, azaz 57 gén esetében figyeltünk meg szignifikáns expresszió változást (48-49. táblázatok). Ezek közül 11 db-ot random módon kiválasztva, 9 esetben erősítette meg a DNS lapka vizsgálatunk eredményeit a QRT-PCR. A venlafaxin több génnek az expresszióját változtatta meg, mint a korábbi kísérleteinkben az imipramin, citalopram és a mirtazapin kezelés (Palotás és mtsai 2003; Palotás és mtsai 2004a,b,c). Az 57 gén közül 36 fokozott mértékben expresszáldott (48. táblázat), míg 26 darab represszáldott (49. táblázat).

A venlafaxin a celluláris szignalizációs és plaszticitási folyamatokban, immunfunkciókban és a neuro-immun működésekben szerepet játszó gének működésére hatott legnagyobb mértékben. A korábban vizsgált hangulatjavító hatású molekulákhoz hasonlóan, sem

a noradrenerg és szerotoninerg, sem a dopaminerg transzmisszióval kapcsolatos gének működését nem befolyásolta döntően a venlafaxin kezelés a perifériás limfocitákban (Palotás és mtsai 2003; 2004a,b,c), hiszen egyetlen neurotranszmisszióval kapcsolatos gén, a szinaptotagmin IV fokozott expresszióját figyeltük meg. A szinaptotagmin a szinaptikus vezikuláris transzport komponense. Fontos megjegyeznünk azonban, hogy eredményeink nem zárják ki annak a lehetőségét, hogy a KIR-ben teljesen más génexpressziós mintázatot kapnánk, mint a limfocitákban.

A korábban vizsgált molekulákhoz hasonlóan, a venlafaxin is erősen megváltoztatta számos, a transzkripció regulációjával és a kromatin szerveződésével kapcsolatos gén expresszióját. Ezek közül a RING1, MIXL esetében fokozott transzkripciót (48. táblázat), míg a FLJ20303, HSPC052 és a TF 12 gének esetében pedig repressziót okozott (49. táblázat). A venlafaxinnal kapcsolatos eredményeink is felhívják tehát a figyelmet az antidepresszívumok genomikus hatásainak fontosságára. Ez a hatásuk a neurogenesis és a neuronális regeneráció szempontjából is fontos lehet (Duman 2004).

A venlafaxin citokinézissel kapcsolatos génekre (C17orf1; KIAA1151) kifejtett hatása a limfociták migrációs készségéhez és a diapedezis funkciójához kapcsolható, mivel a migrációs folyamat a citoskeletális fehérjék jelentős fokú átrendeződését kívánja. A venlafaxin genomikus hatásával kapcsolatos kísérleteink eredményei is megerősítik az antidepresszívumok immunfunkciókat moduláló hatásáról szóló adatokat (Russo-Neustadt és mtsai 1999).

Összefoglalva, elsőként számoltunk be a SNRI hatású venlafaxin transzkriptom szintű hatásairól idős, depressziós betegek limfocitáiban (Kálmán és mtsai 2005c). Korábbi, más antidepresszív hatású vegyületekkel végzett vizsgálatainkhoz hasonlóan, ez a molekula sem a biogén aminok anyagcseréjével kapcsolatos gének expresszióját változtatta meg a humán limfocitákban, hanem a kromatin működésében, celluláris szignalizációs és plaszticitási folyamatokban, immunfunkciókban szerepet játszó gének működésére hatott, és ezért a molekula perifériás immun-modulátor hatása is feltételezhető. Eredményeink az antidepresszívumok komplex, nem csak a neurotranszmitterek szintjén megnyilvánuló hatásait erősítik meg.

3.21. Hogyan befolyásolják az antipszichotikumok a génexpressziót patkányok agyában?

Antipszichotikumokat használunk a demens betegek viselkedési és pszichés tüneteinek kezelésére, és az időskori delírium szindrómák agitációs tünetcsoportja esetén is (Tariot és Ryan 2001). Ezek a tünetek a demens betegek 90%-ában fordulnak elő, és gyakoriságuk a betegség progressziójával fokozódik (Merriam és mtsai 1988; Rajna és Tariska 2000; Tariska 2000). Az agitált és az agresszív viselkedés különböző formái, a hallucinációk és téveszmék miatt kialakult ápolási problémák képezik továbbá az intézeti beutalások és ápolási otthonokban való elhelyezés

legfőbb indikációit (Ferris és mtsai 1987; Coen és mtsai 2002).

Annak ellenére, hogy a típusos és az atípusos antipszichotikumokat gyakran írják fel a demencia szindrómákhoz társuló említett indikációkban, alig rendelkezünk adatokkal arra vonatkozóan, hogy ezek a molekulák hogyan befolyásolják az AK és a többi demencia forma kimenetelét, patomechanizmusát. Arra vonatkozóan sem ismerünk adatokat, hogy hogyan hatnak ezek a molekulák transzkriptom szinten a KIR-ben. Mivel az utóbbi három évben több klinikai farmakológiai vizsgálat hívta fel a figyelmet arra, hogy eddig ismeretlen okból több atípusos antipszichotikum növeli az időskori cerebrovaszkuláris betegségek gyakoriságát és mortalitási rizikóit (Wang és mtsai 2005), ezért időskori indikációjukat számos ország hatósága visszavonta, vagy korlátozta (Rabins és Lyketsos 2005). Az atípusos, második generációs antipszichotikumok időskori alkalmazásának és hatásmechanizmusának tisztázatlan kérdései miatt döntöttünk úgy, hogy vizsgálataink következő szakaszában ezeknek a molekuláknak transzkriptomikai hatását térképezzük fel a KIR-ben (Palotás és mtsai 2003a; Fehér és mtsai 2005).

Kísérleteinkben a referencia molekulának számító haloperidol és a jelenleg egyetlen időskori indikációban engedélyezett atípusos szer, a risperidon 96 órás, akut, és 4 hetes, krónikus *in vivo* kezelésének hatásait hasonlítottuk össze patkányok agykérgében. Eredményeinket az 50-56. táblázatok foglalják össze.

Eredményeink szerint, a vizsgált 8 000 génből 36 gén (0.45%) agyi transzkripcióját változtatta meg a haloperidol kezelés (50-52. táblázatok). Az akut kísérletekben 15 gén represszáldott, 13-nál pedig fokozott expressziót találtunk (50-51. táblázatok). A krónikus, 4 hetes kezeléseket követően pedig 0/9 volt ez az arány (52. táblázat).

50. táblázat Az akut (96 órás) haloperidol kezelés hatására fokozott mértékben expresszáldott gének listája a patkány agykérgében.

A klón neve (mRNS)	Génbanki szám	Funkció	A változás mértéke
Follistatin-like protein	AA818445	sejtciklus és növekedés	1.09
Rat basic fibroblast growth factor (FGF) mRNA, complete cds	M22427	sejtciklus és növekedés	1.19
Protein O-mannosyltransferase 1	NM 053406	anyagcsere	1.15
<i>Rattus norvegicus</i> cDNA clone, similar to Human B12 protein mRNA	AA900186	iontranszport	1.96
S100 calcium-binding protein A8 (calgranulin A) (S100A8)	NM 053822	iontranszport	1.41
Glutamate receptor subunit GluR2-flip mRNA, complete cds	AF164344	neurotranszmisszió	1.22
Calmodulin 2, mRNA, complete cds	BC058485	iontranszport	1.13
Glutathione S-transferase A5 (Gsta5),mRNA	NM 031509	anyagcsere	1.19

<i>Rattus norvegicus</i> similar to eosinophil peroxidase (LOC303414), mRNA	XM 220834	anyagcsere	1.21
Adrenal mitochondrial protease	NM 153311	protein anyagcsere	1.97
G protein-binding protein CRFG	NM 053689	szignáltranszdukció	1.06
Ly-49 stimulatory receptor 3	NM 153726	szignáltranszdukció	1.20
<i>Rattus norvegicus</i> APP770 mRNA, complete cds	AF513015	ismeretlen	1.76

51. táblázat Az akut (96 órás) haloperidol kezelés hatására represszáldott gének listája a patkány agykéregben.

A klón neve (mRNS)	Génbanki szám	Funkció	A változás mértéke
Pleiotrophin (heparine binding factor)	NM 017066	sejtciklus és növekedés	-1.11
Serotonin N-acetyltransferase	NM 012818	anyagcsere, szignalizáció	-2.15
Activity regulated cytoskeletal-associated protein	NM 019361	citoszkeleton	-1.99
α -prothymosin	M86564	immunválasz	-1.48
Inwardly rectifying K ⁺ -channel	D61687	iontranszport, szignalizáció	-1.89
Voltage-dependent calcium channel γ -7 subunit (Cacng7) mRNA, complete cds	AF361349	iontranszport, szignalizáció	-1.21
Tyrosine aminotransferase	NM 012668	anyagcsere	-2.68
<i>Rattus norvegicus</i> mRNA for endothelial nitric oxide synthase, 3' region, partial	AJ011116	anyagcsere	-1.57
Clathrin assembly protein long form	AF041374	protein anyagcsere	-1.04
SH3 domain binding protein (CR16)	U25281	protein anyagcsere	-1.82
Disintegrin and metalloprotease domain 2	NM 020077	protein anyagcsere	-2.15
MIBP1 (c-myc intron-binding protein 1)	D37951	transzkripció reguláció	-0.99
Gap junction membrane channel β 5	NM 019241	sejt interakció	-1.24
Type I pro- α_2 collagen-like sequence	AF050214	szkeleton	-3.25
TPCR09 protein	X89698	anyagcsere	-2.07

Az akut haloperidol kezelés szignifikáns mértékben indukálta a patkány APP mRNS-ének transzkripcióját (50. táblázat). Az APP fiziológiás funkciói nem ismertek pontosan, de neurotrofikus, neuroprotektív, szinaptikus plaszticitás reguláló és Ca²⁺ háztartást szabályozó hatásait is feltételezik, illetve bizonyították (Mattson és mtsai 1993; Masliah és mtsai 1997). Az APP mRNS-ének indukciója lehet egyrészt a haloperidol ismert neurotoxikus hatásának a következménye (Avent és mtsai 1996), másrészt az is elképzelhető, hogy az akut kezelés direkt neuroprotektív mechanizmusokat indukál az agyban. A haloperidolról ismert, hogy OS-t válthat ki és neurotoxikus, valamint apoptózis indukáló hatással is rendelkezik (Behl és mtsai 1996), de genomikus hatásai nem tisztázottak. Eredményeink szerint az akut haloperidol kezelés számos, a biogén aminok anyagcseréjével kapcsolatos gén expresszióját is represszálta pl. 5HT N-

acetiltranszferáz, tirozin aminotranszferáz. Ezek mellett, a szinaptikus kapcsolatok és plaszticitás, valamint a szkizofrénia patomechanizmusa szempontjából fontos dezintegrin génjének represszálását tartjuk eredményeink közül kiemelkedő fontosságúnak (51. táblázat). Eredményeink szerint a krónikus haloperidol kezelés a vizsgált gének transzkripciójára minimális mértékben hatott, és ezek többsége éppen hogy meghaladta az általunk önkényesen meghatározott 1.5-ös határértéket (52. táblázat) és ez hosszútávú humán alkalmazásának biztonságosságára utal.

52. táblázat A 4 hetes haloperidol kezelés hatására megváltozott mértékben expresszálódott gének listája a patkány agykéregben.

A klón neve (mRNS)	Génbanki szám	Funkció	A változás mértéke
Follistatin-like protein	AA818445	sejtciklus és növekedés	1.58
Transducin-like enhancer of split 4	NM 019141	fejlődés	1.51
K ⁺ -channel (erg2)	AF016192	iontranszport	1.11
Acyl-Coenzyme A dehydrogenase, C-4-12	NM 016986	anyagcsere	0.97
Extracellular signal-related kinase (ERK2)	M64300	szignál transzdukció	1.02
G protein-binding protein CRFG	NM 053689	szignál transzdukció	1.31
Relaxin-like factor	AF139918	szignál transzdukció	1.37
Endothelin receptor	NM 017333	szignál transzdukció	1.69
U2 RNA 3' end	M10882		1.59

Az APP génjének indukciója mellett a másik, fokozott érdeklődésre számot tartható megfigyelésünk az endothelin receptorának génjével kapcsolatos, hiszen a krónikus haloperidol kezelést követően a legnagyobb mértékű változást (1.69) az endothelin receptor génjének indukciójában találtuk (52. táblázat). Ugyanezt a gént hasonló mértékben indukálta az akut risperidon kezelés is, krónikus alkalmazása esetén azonban kismértékű represszióját figyeltük meg (53. és 56. táblázatok). Az endothelin és receptora neuroendokrin és neuromodulátor hatással rendelkezik és a kardiovaszkuláris működések szabályozásában is részt vesz. Az is ismert, hogy az endothelin receptorok stimulációja dopamin felszabadulást okoz a KIR-ben (Van den Buuse és Webber 2000), valamint, hogy hatásuk a foszfatidil inozitol kaszkádot aktiválva, az intracelluláris Ca²⁺ szintek emelésével érvényesül (Reiser és Donié 1990). A haloperidol és a risperidon tehát közvetlenül vagy közvetve, az endothelin expresszió fokozásával neuroendokrin, neuromodulátor vagy akár neurotoxikus hatású is lehet. A molekula ilyen jellegű genomikus hatása kapcsolatba hozható az antipszichotikumok számos más hatásával (pl. endokrin) és mellékhatásával (pl. kardiovaszkuláris). Kataoka és mtsai (1995) adatai szerint az endothelin rendszer stimulálása a glutamát rendszert, azon belül az NMDA receptorokat is aktiválja és így

excitotoxikus és peroxidatív károsodást okoz. Az a megfigyelésünk, hogy mind a haloperidol, mind a risperidon képes az endotelin rendszer fokozott aktivációjára, transzkripció szinten magyarázhatja az antipszichotikumok már korábbról is ismert szabad gyök indukáló és neurotoxikus hatását (Behl és mtsai 1996).

Az antipszichotikumok endotelin receptor gén indukáló hatása magyarázhatja a szedésükkel kapcsolatosan megfigyelt és az utóbbi időben igen sokat vitatott emelkedett kardiovaszkuláris rizikót, mortalitást fokozó hatásukat is (Herrmann és Lancetot. 2005), hiszen az endotelinek a kardiovaszkuláris működések szabályozásának igen fontos regulátorai (Marasciulo és mtsai 2006). Eredményeink arra utalnak, hogy az antipszichotikumok szedése a perifériás és centrális endotelin rendszer stimulációja révén emelhetik a vaszkuláris betegségek és az ezzel kapcsolatos szövődmények kockázatát a fogékony személyek esetében.

A risperidon kezelés kétszer annyi transzkriptom változást okozott mint a haloperidol, hiszen 89 gén (1.11%) esetében találtunk eltérést (53-56. táblázatok). Ezek többsége akut hatásként jelentkezett (43 gén indukálódott, 46 represszálódott) (53-54. táblázatok). A krónikus kezelési modellben 6/11 volt ez az arány (55-56. táblázatok). Az a megfigyelésünk, hogy az akut risperidon kezelés több gén aktivációját eredményezte, mint a haloperidol, a risperidon haloperidolnál gazdagabb receptor kötődési profiljára vezethető vissza, hiszen a D₂, 5HT₂, α₁, α₂ adreno és H₁ receptorokhoz is kötődik, a haloperidol pedig főleg D₂ és σ₁ receptor antagonistá hatású.

53. táblázat Az akut (96 órás) risperidon kezelés hatására fokozott mértékben expresszálódott gének listája a patkány agykéregben.

A klón neve (mRNS)	Génbanki szám	Funkció	A változás mértéke
Integrin α-subunit	S58528	sejt adhézió	1.13
Integrin β ₁	NM_017022	sejt adhézió	1.70
Plakoglobin	U58858	sejt adhézió	2.20
Pleiotrophin (heparine binding factor)	NM_017066	sejtciklus és növekedés	1.11
KIAA1536 protein	NM_139190	sejtciklus és növekedés	1.28
Follistatin-like protein	AA818445	sejtciklus és növekedés	1.96
Protein O-mannosyltransferase 1	NM_053406	anyagcsere	1.57
HES-related repressor protein 1 (HERP1)	AY059382	transzkripció	1.00
RING finger protein	AF036255	anyagcsere	2.07
Transducin-like enhancer of split 4	NM_019141	szignalizáció	1.52
Transmembrane receptor Robo1	AF041082	szignalizáció, immun	1.71
T-cell receptor α-chain RT1L haplotype	L11027	immun	1.57
Small inducible cytokine subfamily A20	NM_019233	immun	2.31
Synaptotagmin VII	U20106	szignalizáció	1.62
RAB15	M83679	szignalizáció	2.24
ryk-tyrosine kinase-related protein	AB073721	szignalizáció	2.67
Janus protein tyrosine kinase 1, JAK1	AJ000556	szignalizáció	1.48
YME1 (<i>S. cerevisiae</i>)-like 1	NM_053682	anyagcsere	1.14
Aminopeptidase PILS	AF148324	anyagcsere	1.15
Adrenal mitochondrial protease	NM_153311	anyagcsere	1.47

Cathepsin K	AF010306	immun	1.89
CLN2 tripeptidyl peptidase I	AB043870	anyagcsere	2.35
Similar to human B12 protein	AA900186	iontranszport	1.77
K ⁺ -channel (erg2)	AF016192	iontranszport	2.08
Na ⁺ -channel, voltage-gated, type 10a	NM 017247	iontranszport	1.01
Vacuolar adenosine triphosphatase-β	Y12635	iontranszport	1.40
ATPase, Na ⁺ /K ⁺ transporting, α ₁	NM 012504	iontranszport	2.00
Acyl-Coenzyme A dehydrogenase, C-4-12	NM 016986	anyagcsere	2.13
Kruppel-like factor LKLF	AA925780	transzkripció reguláció	1.92
Prophet of Pit1, paired-like homeodomain	NM 153627	transzkripció reguláció	1.96
Activating transcription factor 3	NM 012912	transzkripció reguláció	2.50
Splicing factor 1 homolog	AF079873	szignál transzdukció	1.75
SH-PTP2 protein tyrosine phosphatase 11	NM 013088	szignál transzdukció	2.74
Receptor activity modifying protein 2	AB042888	szignál transzdukció	1.00
Interleukin 6 receptor	NM 017020	immun	3.12
G protein-binding protein CRFG	NM 053689	szignál transzdukció	1.89
Endothelin receptor	NM 017333	szignál transzdukció	2.04
P-glycoprotein-like ATP cassette transporter	AF106563	transzport	1.02
Mgl	AY035343		1.48
FSH-regulated protein	L26292	anyagcsere	1.71
Integrin-binding sialoprotein	NM 012587	szignál transzdukció	2.14
Ly-49 stimulatory receptor 3	NM 153726	szignál transzdukció	1.84
Neurexin IIIα (axon guidance)	L14851	szignalizáció	2.84

54. táblázat Az akut (96 órás) risperidon kezelés hatására represszáldott gének listája a patkány agykéregben.

A klón neve (mRNS)	Génbanki szám	Funkció	A változás mértéke
Neural adhesion molecule F3	D38492	sejt adhézió	-1.37
BIT	D38468	sejt adhézió	-1.12
CD5	X78985	sejt adhézió	-2.60
Growth accentuating protein 43	NM 017195	sejtciklus és növekedés	-1.01
Serotonin N-acetyltransferase	NM 012818	szignalizáció	-1.31
Activity regulated cytoskeletal-associated	NM 019361	citoszkeleton, fejlődés	-2.31
α-actinin 4	AF190909	citoszkeleton, fejlődés	-1.19
Protein phosphatase 1, regulatory 14a	NM 130403	metabolizmus	-2.61
α-prothymosin	M86564	immun	-1.62
EFA6 exchange factor for ARF6	AB040468	protein metabolizmus	-1.40
ARL5 ARF-like protein 5	X78604	protein metabolizmus	-1.31
Ubiquitin C (Ubc)	NM 017314	protein metabolizmus	-1.54
Clathrin assembly protein long form	AF041374	protein metabolizmus	-1.61
SH3 domain binding protein (CR16)	U25281	protein metabolizmus	-1.59
Hippocalcin (Hpca)	NM 017122	protein metabolizmus	-1.63
Disintegrin and metalloprotease domain 2	NM 020077	protein metabolizmus	-2.15
Disintegrin and metalloproteinase domain 1	NM 020078	protein metabolizmus	-1.09
Voltage-dependent calcium channel g8	NM 080696	iontranszport	-2.21
Plasma membrane CA ²⁺ -ATPase 3	M96626	iontranszport	-1.47
Inwardly rectifying K ⁺ -channel	D61687	iontranszport	-2.32
Mitochondrial H ⁺ -ATP synthase-α	J05266	metabolizmus	-1.16
Uncoupling protein 2, mitochondrial	NM 019354	metabolizmus	-1.53
Alkaline phosphatase, tissue-nonspecific	NM 013059	metabolizmus	-1.17
Tyrosine aminotransferase	NM 012668	metabolizmus	-1.52
γ-glutamylcysteine synthetase	NM 017305	metabolizmus	-2.12
MIBP1 (c-myc intron binding protein 1)	D37951	transzkripció reguláció	-1.13
Extracellular signal-related kinase (ERK2)	M64300	szignalizáció	-1.95
Interleukin 10 receptor-α	NM 057193	immun	-2.68

Basignin (Ox47 antigen or CE-9)	NM 012783	szignalizáció	-2.02
Relaxin-like factor	AF139918	szignalizáció	-1.95
Soluble adenylyl cyclase (SAC)	AF081941	szignalizáció	-2.37
Messenger RNA for preproalbumin	V01222	metabolizmus	-1.17
Vesicular GABA transporter	AF030253	szignalizáció	-1.41
gcd-10S	AB046592	transzport	-1.17
Gap junction membrane channel $\beta 5$	NM 019241	sejt interakció	-1.11
Type I pro- α_2 collagen-like sequence	AF050214	szkeleton	-3.77
Putative zinc-finger protein	AJ007467	metabolizmus	-3.40
U2 RNA 3' end	M10882		-2.63
Glucagon (Gcg)	NM 012707	metabolizmus	-2.17
LIM homeodomain protein 3 β	AF370447	szignalizáció	-1.61
Limkain $\beta 1$ (Lkap)	NM 133421	szignalizáció	-1.38
mud-2	U70266	metabolizmus	-1.28
Zinc finger protein 2 (DZF2)	U78130	metabolizmus	-1.11
Axomer-8, transported in axons	AB097858	citoszkeleton és	-1.00
DnaJ-like protein (heat shock response)	U53922	stressz-válasz	-1.15
TPCR09 protein	X89698	metabolizmus	-1.21

A krónikus risperidon szedést követő változások közül a protein phosphatase 1 regulatory 14a és a receptor activity modifying protein 2 gének fokozott transzkripció aktivitása emelhető ki (55. táblázat). Mindkettő a szubcelluláris szignalizációs folyamatok komponense és a neuronális plaszticitás modulátora. Érdekes megfigyelésünk, hogy sem a krónikus haloperidol, sem a krónikus risperidon kezelés nem okozott szignifikáns mértékű repressziót az általunk vizsgált génekben (56. táblázat). Mivel azonban tudjuk, hogy a DNS lapka transzkriptomikai vizsgálatok egyik igen komoly metodológiai problémája, hogy a kis elemszámban előforduló gének transzkripciójára nem igazán érzékeny ezért a jelen, és a doktori értekezés többi részében bemutatott hasonló vizsgálataink esetében is számolnunk kell azzal a lehetőséggel, hogy ezekre a génekre nem adnak pontos információkat kísérleteink.

55. táblázat A 4 hetes risperidon kezelés hatására fokozott mértékben expresszáldott gének listája a patkány agykéregben.

A klón neve (mRNS)	Génbanki szám	Funkció	A változás mértéke
Follistatin-like protein	AA818445	sejtciklus és növekedés	1.09
Protein phosphatase 1, regulatory 14a	NM 130403	metabolizmus	2.30
Acyl-Coenzyme A dehydrogenase, C-4-12	NM 016986	metabolizmus	1.24
Prophet of Pit1, paired-like homeodomain	NM 153627	transzkripció reguláció	1.69
Extracellular signal-related kinase (ERK2)	M64300	szignalizáció	1.35
Receptor activity modifying protein 2	AB042888	szignalizáció	3.35

56. táblázat A 4 hetes risperidon kezelés hatására represszáldott gének listája a patkány agykéregben.

A klón neve (mRNS)	Génbanki szám	Funkció	A változás mértéke
EFA6 exchange factor for ARF6	AB040468	protein anyagcsere	-1.04
Clathrin assembly protein long form	AF041374	protein anyagcsere	-1.49
Janus protein tyrosine kinase 1, JAK1	AJ000556	szignalizáció	-1.37
Inwardly rectifying K ⁺ -channel	D61687	iontranszport	-1.65
Uncoupling protein 2, mitochondrial	NM_019354	metabolizmus	-1.25
Alkaline phosphatase, tissue-nonspecific	NM_013059	metabolizmus	-1.67
Endothelin receptor	NM_017333	szignalizáció	-1.03

P-glycoprotein-like ATP cassette	AF106563	metabolizmus	-1.13
U2 RNA 3' end	M10882		-1.56
Limkain β 1 (Lkap)	NM_133421	szignalizáció	-1.16
TPCR09 protein	X89698		-0.91

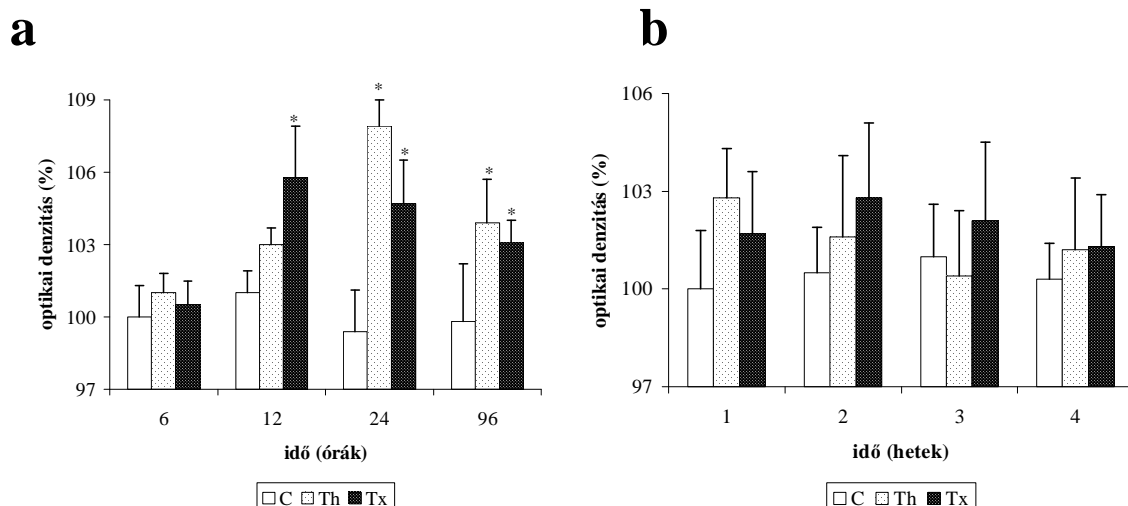
Összefoglalva, a típusos antipszichotikumok közé tartozó haloperidol és az atípusos risperidon akut és krónikus transzkriptomikai hatásait vizsgálva a patkányok KIR-ében a szinaptikus plaszticitásban és sejt szignalizációs rendszerekben részt vevő gének expressziójának modulációját mutattuk ki (Fehér és mtsai 2005). Eredményeink szerint az akut haloperidol kezelés szelektíven fokozta az APP gén transzkripcióját, amely az AK-os betegekben történő alkalmazása szempontjából lehet fontos. Az endotelin receptor transzkripcióját pedig mindkét antipszichotikum stimulálta. Ez a hatás az antipszichotikumok emelkedett időskori kardiovaszkuláris mortalitási rizikójával hozható kapcsolatba. A nemzetközi viszonylatban is újnak minősülő eredményeink az antipszichotikumok komplex, nem csak a neurotranszmitterek szintjén megnyilvánuló hatására szolgáltatnak bizonyítékokat, és felhívják a figyelmet időskori alkalmazásuk veszélyeire is.

3.22. Hogyan befolyásolják az antipszichotikumok az APP agyi metabolizmusát patkányokban?

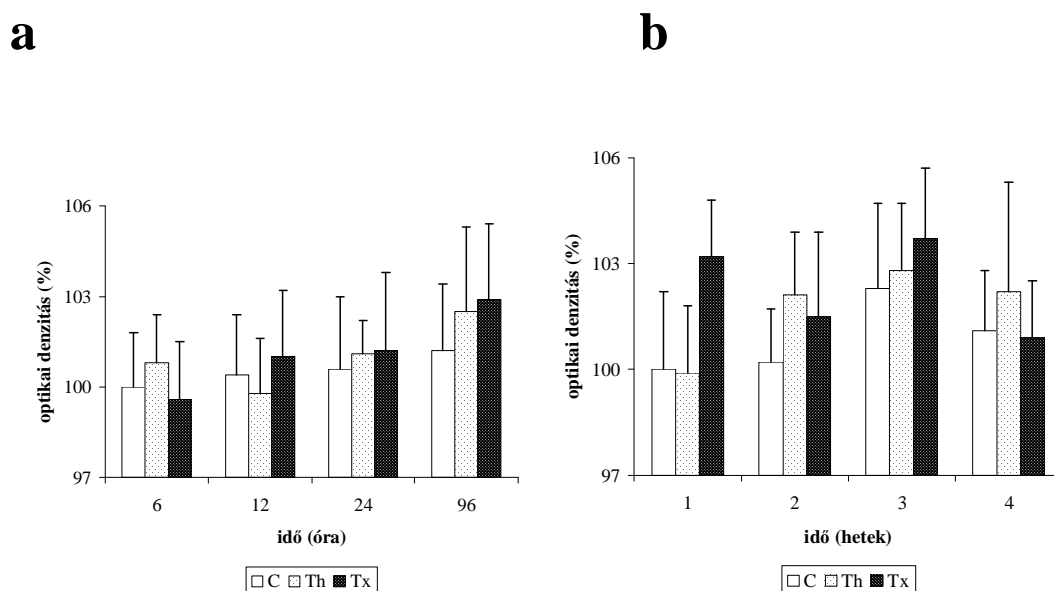
Az előző pontban ismertetett kísérleteink eredményei arra utalnak, hogy a típusos antipszichotikum csoport etalon molekulájának, a haloperidolnak terápiás dózisa akut kísérletekben fokozza az APP transzkripcióját, de ez a hatás nem érvényesül sem a molekula krónikus alkalmazásakor, sem az atípusos szer, a risperidon esetében (Fehér és mtsai 2005). Mivel a haloperidol általunk megfigyelt transzkripció szintű hatásai nem feltétlenül jelentik azt, hogy a várható eltérések fehérje transzlációs szinten is megnyilvánulnak, azaz emelkedett agyi APP szinteket találunk a haloperidol kezelt patkányok agyában, ezért kísérleteink következő szakaszában akut és krónikus, terápiás és toxikus haloperidol és risperidon kezelések APP szintű *in vivo* hatásainak nyomonkövetését tűztük ki célul (Palotás és mtsai 2003b). Eredményeinket a 18-19. ábrák mutatják be.

Fontos metodikai szempont, hogy a kísérleteinkben használt monoklonális ellenanyag nem különböztette meg az egyes APP izoformákat, továbbá az amiloidhoz hasonló, 2-es típusú prekursor proteint is felismerte (Wolozin és mtsai 1996). Az amiloidogén és nem amiloidogén peptidek arányait és mennyiségét ezért nem tudtuk meghatározni.

Eredményeink szerint az akut terápiás és toxikus dózisú haloperidol kezelés kismértékű (2-6%-os), de szignifikáns APP szint emelkedést okozott 12-96 órával a beadást követően (18. ábra). A krónikus 1-4 hetes kezelés, sem a terápiás, sem a toxikus dózist alkalmazva nem változtatta meg az agyi APP szinteket.



18. ábra Akut (a) és krónikus (b) terápiás (Th) és toxikus (Tx) haloperidol kezelés hatása a kortikális APP szintekre patkány agyban. Szemikvantitatív Western immunoblot meghatározások. (C) Kontroll csoport.



19. ábra Akut (a) és krónikus (b) terápiás (Th) és toxikus (Tx) risperidon kezelés hatása a kortikális APP szintekre patkány agyban. Szemikvantitatív Western immunoblot meghatározások. (C) Kontroll csoport.

A jelen kísérleteinkben megfigyelt, akut haloperidol kezelés következtében létrejött APP szintek kismértékű emelkedés mértékét arányban lévőnek tartjuk az előző pontban bemutatott és megbeszélte transzkriptómiai kísérleteinkben leírt APP RNS mennyiségi növekedésének mértékével (1.76x; 50. táblázat) (Fehér és mtsai 2005). Az APP egy filogenetikus ősi molekulaként ismert, analóg szekvenciái már a férgekben és az ízeltlábúakban is kimutathatóak, anyagcseréje pedig rendkívül szoros és multiplex szabályozás alatt áll (Selkoe 2001; Mattson 2004), ezért feltételezhető, hogy megfigyeléseinkhez hasonló, relatíve kismértékű expressziós változások is már jelentős eltéréseket okozhatnak a fehérje KIR-i funkcióiban.

Az irodalomban elsőként igazoltuk a haloperidol APP szinteket emelő hatását *in vivo*. Az itt bemutatott protein szintű kísérleti eredményeink megerősítik korábbi, transzkriptomikai eredményeinket a haloperidol akut hatásait illetően.

A haloperidol APP szinteket emelő hatásának patomechanizmusa nem ismert. Az antipszichotikum multiplex hatása feltételezhető, hiszen lehet, ahogy előző pontban említett kísérleteink is bizonyítják, hogy az APP gén transzkripcióját fokozza (Fehér és mtsai 2005), de az is lehet, hogy a transláció vagy a poszt-transzlációs processzing, vagy akár más receptorok működésének szabályozása révén fejt ki hatását.

A transzkripciós faktorok közül a haloperidol többek között az NF κ B aktivitását is fokozza (Paul és Purdy 1992), erről a transzkripciós faktorról pedig ismert, hogy az APP transzkripciójának szabályozásában is részt vesz (Yan és mtsai 1995).

Az antipszichotikumok az APP poszt-transzlációs processzing szintjén kifejtett hatását támasztják alá Higaki és munkatársainak (1997) eredményei, amelyek a haloperidol szekretáz gátló képességét igazolták, és így feltételezhetően részt vehet az APP amiloidogén metabolizmusának gátlásában. A klinikai megfigyelések is fontos ide vonatkozó érveket nyújtanak, hiszen a szkizofréniás betegek között az AK ritkábban fordul elő (Arnold és mtsai 1994; Higaki és mtsai 1997), és ezt a jelenséget a krónikus antipszichotikum használat következményének tartják (Casanova és mtsai 1993).

Az említetteken kívül a molekula D₂ receptor antagonistá hatását, a következményes csökkent PKC mediált folyamatokkal és Ca²⁺ szignalizációval (Giambalvo 1988; Cedazo-Minguez és mtsai 2001), vagy a σ_1 antagonistá hatását is feltételezhetjük azonban, mint potenciális APP metabolizmussal interferáló tényezőket. A KIR-I σ_1 receptorok a Ca²⁺ szignalizációs folyamatokkal kapcsolt ionotróf, metabotróf és feszültség-függő Ca²⁺ csatornák működését modulálják (Walker és mtsai 1990). Mivel az APP metabolizmus is Ca²⁺ regulált folyamat (Mattson és mtsai 1993; 1997), annak a lehetőségét sem zárhatjuk ki, hogy a haloperidol σ_1 receptor antagonistá hatása felelős az általunk megfigyelt eltérésekért.

Eredményeink szerint a risperidon kezelések egyik formája sem okozott szignifikáns kortikális APP szint változásokat, bár enyhén, de nem szignifikáns mértékben emelkedett fehérje szinteket minden kezelési variációjában ki tudtunk mutatni (19. ábra). Ezek a megfigyeléseink arra utalnak, hogy a risperidon alkalmazása az AK amiloid anyagcseréje szempontjából biztonságosnak tekinthető. A receptoriális funkciókat tekintve a risperidon a monoaminerg receptorok antagonistájaként is működik, így az 5HT receptorok közül elsősorban az 5HT_{2A} és az 5HT₇ receptorokat blokkolja (Kinon és Lieberman 1996). Az 5HT_{2A} receptorok stimulációja az *in vitro* adatok szerint APP szekréciót fokozó hatású (Nitsch és mtsai 1992; Arjona és mtsai 2002). Ezt figyeltük meg saját vizsgálatainkban is (Pákási és mtsai 2005). Az akut risperidon

kezelés 5HT_{2A} receptor blokkoló hatása tehát csökkentheti a szekretált APP izoformák arányát, mennyiségét. A risperidonnak az 5HT receptorokon megnyilvánuló effektusa is magyarázhatja kísérleti eredményeinket, feltételezve, hogy az egyik neurotranszmitter rendszer APP össz mennyiséget növelő hatását a másik rendszer ellentétes irányú hatása kompenzálhatja. Kísérleteink egyik legfontosabb klinikai üzenete, hogy a risperidon akut és krónikus szedése nincs hatással az agyi APP metabolizmusra és ezért valószínűleg biztonságosan adagolható az AK, vagy AK rizikójú betegeknek.

Összefoglalva, az APP szintek agyi változásait nyomonkövető kísérleteink eredményei szerint csak a haloperidol rövidtávú szedése emeli meg a kortikális APP mennyiségét, a risperidon nem rendelkezik ilyen jellegű hatásokkal (Palotás és mtsai 2003b). Adataink arra utalnak, hogy hosszú távon mindkét fajta antipszichotikum biztonságosan alkalmazható az APP metabolizmusa szempontjából az AK viselkedési tüneteinek kezelésére. Adataink azonban nem zárják ki más, akár eredményeinkkel ellentétes mechanizmusok érvényesülését e gyógyszerek AK specifikus hatásaiban.

3.23. Az addiktív szerek közül a 3,4-metiléndioximetamfetamin (MDMA) és a morfin krónikus adagolása hogyan befolyásolja az APP agyi anyagcseréjét?

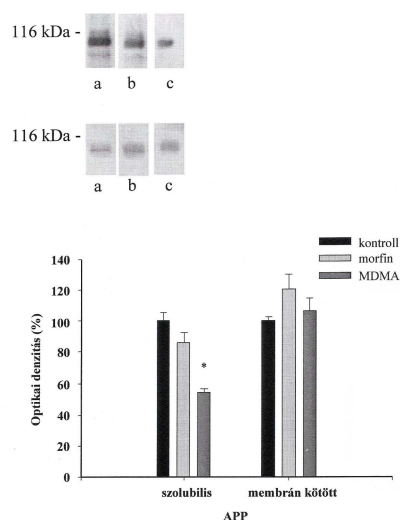
Előző, antidepresszívumokkal és antipszichotikumokkal végzett kísérleteink eredményei arra hívták fel a figyelmet, hogy a KIR-i biogén amin rendszereken ható pszichofarmakonok módosíthatják az APP transzkripcióját és poszt-transzlációs processzingjét (Palotás és mtsai 2003b; Pákási és mtsai 2005; Fehér és mtsai 2005).

Az addiktív szerek, így az MDMA és morfin APP metabolizmusra kifejtett hatásai egyáltalán nem ismertek az AK vonatkozásában, holott ezek a molekulák neurotranszmitter szinten a biogén aminokon fejtik ki hatásukat (Gough és mtsai 1991), krónikus abuzív alkalmazásuk továbbá kognitív zavarokat okozhat (Fox és mtsai 2002), amelyeknek a demencia szindróma is komponense, továbbá neurotoxikus hatásokkal is rendelkeznek (Gyarmati és mtsai 2002; Harlan és Kailas 2004). Annak ellenére, hogy a használatukkal való visszaélések az egész világon komoly pszichiátriai és társadalmi problémákat okoznak, hosszú távú KIR-i hatásaikról alig rendelkezünk ismeretekkel. Ráadásul a morfin és származékainak időskori klinikai alkalmazása gyakori a széniummal társuló traumák, malignus folyamatok kezelése során, a társuló fájdalmak csillapítása céljából. Ilyen problémák az AK-os személyeknél is előfordulhatnak. Vizsgálatainkat megelőzően nem rendelkezünk adatokkal arra vonatkozóan, hogy a morfin és származékainak terápiás alkalmazása hogyan hat az AK patomechanizmusára, klinikai tüneteire, lefolyására stb. Kísérleteink következő szakaszában ezért kettő, egymástól teljesen eltérő típusú addiktív szer APP metabolizmusra és BACE szintekre kifejtett krónikus

hatását vizsgáltuk meg *ex vivo* (Kálmán és mtsai 2006a). Eredményeinket a 20-21. ábrák mutatják be.

Szemikvantitatív eredményeink szerint az APP RNS-ek mennyisége nem változott sem a 42 napos MDMA, sem a hasonló idejű morfin kezelés hatására (20. ábra). Tehát, annak ellenére, hogy ezek az anyagok is ugyanazokra a biogén amin neurotranszmitterekre hatnak, mint a korábbi kísérleteinkben vizsgált pszichofarmakonok (Palotás és mtsai 2003a,b; Palotás és mtsai 2004a,b; Fehér és mtsai 2005), APP transzkripció hatásuk eltérő jellegű.

Kísérleteink eredményei szerint a BACE fehérje mennyisége 25%-os növekedést mutatott, de csak a MDMA adagolás hatására a morfin kezelés nem változtatta az enzim mennyiségét (21. ábra). A BACE enzimnek az APP amiloidogén metabolizmusában bizonyították a szerepét (John 2006). Két izoformája ismert, melyek közül az 1-es fokozott mértékben expresszálódik AK-ban (Holsinger és mtsai 2002) és mennyisége is emelkedett a betegek agyában (John 2006). Mivel a termelt BAP mennyisége a BACE expresszió fokozásával párhuzamosan növekszik (Bígl és mtsai 2000), eredményeink arra utalnak, hogy az MDMA kezelés az amiloidogén APP metabolikus utat fokozhatja. Ezt elsőként bizonyítottuk az irodalomban.

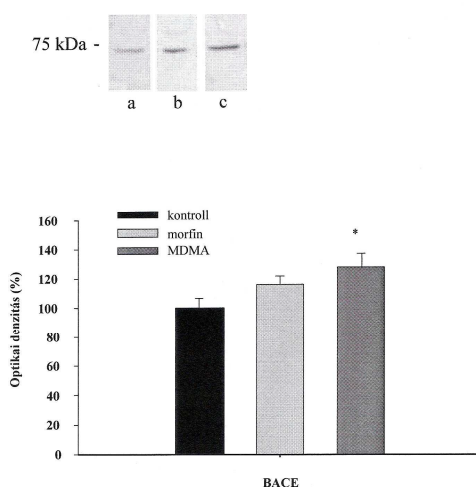


20. ábra A morfin és az MDMA hatása a szolubilis és membrán kötött APP frakciókra a patkány agykéregben. A minták sorrendje: (a) kontroll; (b) morfin (c) MDMA. A szemikvantitatív Western blot mérések eredményeit a KT csoport%-ban fejeztük ki. Az eredmények átlag \pm SD formában vannak ábrázolva. * $p < 0.001$ a KT csoporthoz viszonyítva.

Az MDMA többféle módon befolyásolhatja a BACE és az APP metabolizmusát. Tudjuk, hogy szinaptikus szinten főleg az 5HT felszabadítását fokozza, de növeli a DA és a NA mennyiségét is (Gough és mtsai 1991). Szubcellulárisan azonnali és korai géneket indukál, továbbá fokozza a szabad gyökök termelését és következményes sejtkárosodást okoz (Colado és mtsai 1997). Tamagno és mtsai (2002) bizonyították, hogy az OS fokozza a BACE aktivitást és expressziót. Hasonló eltéréseket találtak agyi iszkémiában és sérülésekben is (Wen és mtsai

2004). Az MDMA indukált fokozott BACE termelés tehát önmagában is hozzájárulhat a neuron pusztuláshoz. Eredményeink új szempontok alapján, az APP metabolizmusra kifejtett hatása révén valószínűsítik az MDMA neurotoxikus hatását.

A másik fontos, nemzetközi viszonylatban is újnak számító megfigyelésünk szerint a szolubilis és membrán kötött APP szinteket összehasonlítva az MDMA kezelés 45%-os szolubilis APP szint csökkenést okozott, de a membrán kötött frakció mennyiségére nem volt hatással (20. ábra). A morfin kezelés pedig nem befolyásolta a kortikális APP szinteket. Az általunk használt kétfajta monoklonális ellenanyag az amiloidogén és nem-amiloidogén APP fragmenseket nem különíti el, így arra vonatkozóan sajnos nem vonhatunk le következtetéseket, hogy az MDMA kezelés által okozott szolubilis APP izoformák arányának csökkenése az amiloidogén vagy a nem amiloidogén processzinget serkenti. Nitsch és mtsai (1996) már korábban igazolták, hogy a szerotonin rendszer stimulációja PKC és PLA₂ mediált folyamatok révén fokozza az APP szekretoros metabolizmusát. Eredményeink alapján feltételezhető, hogy az MDMA kezelés által okozott krónikus 5HT deplécio és szinaptikus degeneráció okozza a szolubilis APP izoformák szignifikáns csökkenését, de a membránok fokozott anyagcseréje, és az APP metabolizmus krónikus down-regulációja is szerepet játszhat a kialakításában.



21. ábra A morfin és az MDMA hatása a BACE protein szintekre a patkány agykéregben. A minták sorrendje: (a) kontroll; (b) morfin (c) MDMA. A szemikvantitatív Western blot mérések eredményeit a KT csoport%-ban fejeztük ki. Az eredmények átlag \pm SD formában vannak ábrázolva. * $p < 0.01$ a KT csoporthoz viszonyítva.

Véleményünk szerint annak ellenére, hogy a krónikus morfin adagolással kapcsolatos eredményeink negatívak, a klinikum szempontjából nagy jelentőségűek, mivel a morfin és származékainak az APP metabolizmus szempontjából való biztonságos használatára hívják fel a figyelmet.

Összefoglalva, a döntően szerotoninerger hatású MDMA krónikus adagolása fokozta az APP amiloidogén metabolizmusában központi szerepet játszó BACE enzim mennyiségét, és

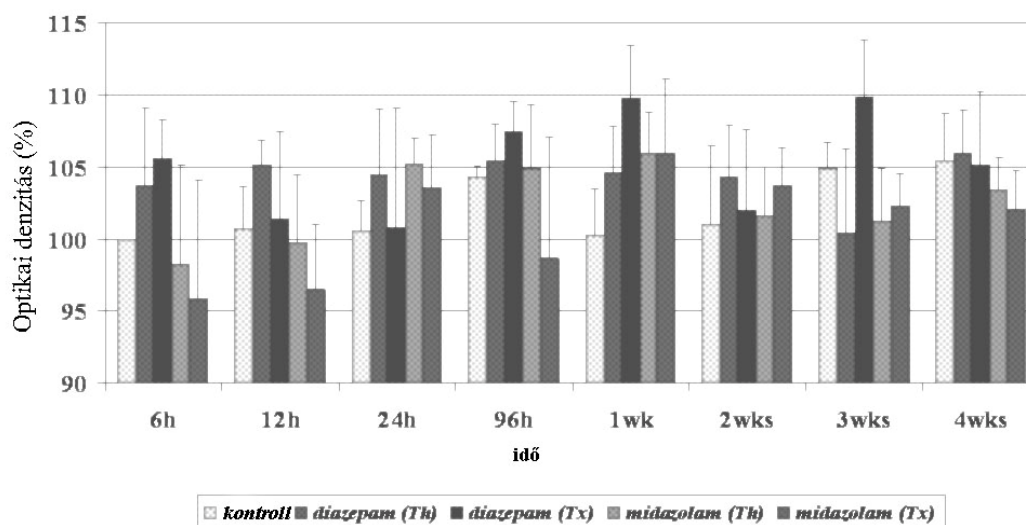
csökkentette a szolubilis APP izoformák arányát a patkányok agykérgében, anélkül, hogy az APP transzkripcióját befolyásolta volna (Kálmán és mtsai 2006a). A krónikus morfin kezelés nem okozott ilyen eltéréseket. A nemzetközi viszonylatban újnak számító eredményeink arra utalnak, hogy az abuzív potenciállal rendelkező MDMA az APP metabolizmus megváltoztatása révén is hat a KIR-ben, amiloidogén hatásai révén neurotoxicitása valószínűsíthető. A KIR-i ópiát rendszer stimulációja az általunk vizsgált paraméterek szerint pedig nincs kölcsönhatásban az APP metabolizmusával.

3.24. Hogyan hatnak a benzodiazepinek az APP szintekre patkány agyban?

A leggyakrabban használt pszichofarmakonok harmadik csoportjának, a benzodiazepineknek a hatását szintén nem vizsgálták az APP metabolizmus irányában, holott használatuk igen elterjedt (az idős személyeknél is sajnos) az alvászavarok alternatív kezelésére. Használatukkal kapcsolatos veszély, hogy nagy abuzív potenciállal rendelkeznek. Az aneszteziológiában premedikációként és az általános anesztézia részeként is alkalmazzák ezeket a molekulákat.

Az általános anesztéziát, mint a kognitív hanyatlás, és az AK kialakulásának rizikóját több klinikai tanulmány is bizonyította (Breteler és mtsai 1991; Bohnen és mtsai 1994; Gasparini és mtsai 2002). Az a kérdés azonban nem tisztázott, hogy az általános anesztézia hatásai, vagy maga a műtéti beavatkozás pl. leggyakrabban koronária bypass műtét (Mullges és mtsai 2000), illetve szövődményei (pl. az invazív beavatkozások következtében kialakuló mikroembolizációs folyamatok) (Roach és mtsai 1996; Brown és mtsai 1997; Newman és mtsai 2001) milyen mértékben vesznek részt az AK specifikus folyamatok beindításában, kialakításában.

Az említett megfontolások alapján kísérleteinkben arra szerettünk volna választ kapni, hogy két, neuropszichiátriai és általános anesztéziái indikációban gyakran használatos benzodiazepin molekula, a diazepam és a midazolam terápiás és toxikus dózisai akut és krónikus adagolásban hogyan változtatják meg az APP mennyiségét patkányok agykérgében (Kálmán és mtsai 2006b). Eredményeinket a 22. ábra foglalja össze.



22. ábra Az APP mennyiségének változásai terápiás (Th) és toxikus (Tx) dózisú diazepam és midazolam adagolása után a patkány agykéregben. Az eredmények a KT érték %-ban kifejezett optikai denzitások, melyek szemikvantitatív Western immunoblot meghatározással készültek (átlag \pm SD).

Kísérleteinkben a kereskedelmi forgalomban elérhető és már korábban is alkalmazott 22C11 monoklonális ellenanyagot használtuk az APP felismerésére. Ahogy korábban is hangsúlyoztam, ez az ellenanyag azonban sajnos nem képes az amiloidogén és nem amiloidogén APP izoformák elkülönítésére, így az APP alternatív splicing-jára vonatkozóan nem következtethetünk ebből a kísérletünkből sem.

Eredményeink elsőként bizonyították, hogy a diazepam és a midazolam terápiás és toxikus dózisa sem akut, sem krónikus adagolásukat követően nem módosítják az APP szintjeit a patkány agykéregében, és ennek megfelelően a BZD-ek semleges hatását feltételezhetjük az AK amiloid hipotézise szempontjából (Kálmán és mtsai 2006b).

A rendelkezésre álló igen kevés kísérletes adat a BZD-ek és a GABA rendszer vonatkozásában igen ellentmondó és nehezen megítélhető az AK ismert patomechanizmusa szempontjából. A BZD-ek többek között a GABA gátló típusú neurotranszmitter hatását erősítik a GABA_A receptorokon. Ennek megfelelően a GABA rendszer aktivációján keresztül fokozhatják a GABA kiváltott gátló hatást a KIR-i kolinerg neuronokon (Farr és mtsai 1999) és ez a tanulási és memória funkciók romlásához vezethet, amely különösen kedvezőtlen lehet az AK és más demenciaformák vonatkozásában. Másrészt, az excitátoros neurotranszmisszió gátlásával a BZD-ek által kiváltott gátlás kedvező lehet az AK glutamát hipotézise szempontjából (Fastbom és mtsai 1998).

AK-ban, hasonlóan más neurotranszmitter rendszerekhez, a GABA szintek csökkenését mutatták ki (Rossor és mtsai 1982; Lowe és mtsai 1988). A BZD-ekkel kapcsolatosan pedig a közelmúltban igazolták, hogy gátolják az amiloidogén gamma szekretáz működését (Churcher és mtsai 2003). A BZD-ek tehát több szempontból protektív, más szempontok alapján pedig

káros hatással rendelkezhetnek az AK vonatkozásában. Eredményeink arra utalnak, hogy az APP szintek tekintetében nincs szignifikáns hatásuk.

Összefoglalva, elsőként vizsgáltuk és bizonyítottuk, hogy a BZD-ek akut és krónikus adagolása nincs hatással az agyi APP szintekre patkányban (Kálmán és mtsai 2006b). Eredményeink arra utalnak, hogy a BZD-ek használata az APP metabolizmusa szempontjából biztonságosnak minősül.

A tökéletes: akár a
tökéletlen.
Működése mérhetetlen.
A teljesség: akár az
üresség.
Működése mérhetetlen.
Az egyenes mint a görbe,
a szellemes, mint a dőre,
az ékes szó, mint a dadogó.
A mozgás a fagyot legyőzi,
a nyugvás a hevet legyőzi,
a béke a rendet megőrzi.
Lao-ce

4. A tudományos eredmények összefoglalása

- 3.1. Elsőként igazoltuk, hogy 4 hetes n-3 zsírsav gazdag halolaj diétás etetés képes megváltoztatni felnőtt patkányok agyi mikroereinek n-3/n-6 zsírsav arányát, és módosítani az endotel sejtek ciklooxigenáz és lipoxigenáz enzimjeinek működését.
- 3.2. A koleszterin diéta divergáló hatását mutattuk ki elsőként az irodalomban, az AP-1 és NFκB transzkripciós faktorok működésére *in vivo*.
- 3.3. Elsőként alkalmaztuk a humán apoB transzgenikus egér állatmodellt az agyi APP metabolizmus tanulmányozására. *In vivo* eredményeink szerint a koleszterin anyagcsere változásai modulálják az agyi APP expressziót és a fehérje szubcelluláris lokalizációját, de az apoB hatása nem additív jellegű a hiperkoleszterinémiával.
- 3.4. Elsőként igazoltuk, hogy az ateroszklerózis patomechanizmusában központi szerepet játszó biglikán elősegíti az APP amiloidogén splicing-ját, míg az apoB expressziója nem módosítja ezt a folyamatot.
- 3.5. Elsőként bizonyítottuk, hogy a demencia tekintetében pozitív családi anamnézisű AK betegek trombocita membránjainak külső rétege csökkent fluiditású. Eredményeink magyarázhatják az AK-os betegek trombocitáiban leírt APP metabolizmus eltéréseit.
- 3.6. Kísérleteink elsőként szolgáltattak bizonyítékot arra vonatkozóan, hogy az apoD specifikus izoformája fordul elő a humán agyban. Immunhisztokémiai módszerrel elsőként mutattuk ki, hogy a humán agyban mind a neuronok, mind a gliasejtek tartalmazhatnak kis mennyiségben apoD molekulákat normál körülmények között, de jelenlétét nem találtuk specifikusnak az AK neuropatológiája szempontjából.
- 3.7. Elsőként számoltunk be arról, hogy hasonlóan az AK-hoz, szubkortikális VD-ban is gyakoribb az E4-es allél mint a KT személyeknél a magyar populációban. Eredményeink szerint nem valószínűsíthető kapcsolat az E4-allél öröklése és a gyermekkori expresszív fejlődési zavar között.
- 3.8. Elsőként bizonyítottuk, hogy a kognitív, mnesztikus teljesítmény apoE genotípus függősége ellenére a szelegilin kezelés kognitív hatásait nem modulálja az AK-os betegek apoE genotípusa.
- 3.9. A neuroprotektív KINA csökkent szintjeit mutattuk ki elsőként az AK-os betegek vérében és vvt-iben. A KINA szintek eltérései a kinurenin metabolizmus perifériás zavarát igazolják AK-ban, amely azonban független a betegek apoE státuszától.

- 3.10.** Elsőként számoltunk be a magyar KT és AK populációban az apoE promoter gén -491A/T polimorfizmusának gyakorisági megoszlásáról. Eredményeink szerint polimorfizmusa nem jelent önálló rizikót az AK szempontjából, de az A-allél közös előfordulása az apoE gén E4-es alléljával kapcsolt és emelkedett AK rizikót hordoz.
- 3.11.** Elsőként számoltunk be a CYP46A1 gén 2-es intronjának T/C allél gyakoriságairól a magyar KT és AK populációkban. Eredményeink szerint a C-allél öröklése sem önmagában, sem az apoE E4-alléllal közösen nem változtatja meg az AK rizikóját.
- 3.12.** Eredményeink elsőként bizonyították, hogy az AChE enzim molekuláris formáinak aránya az aszimmetrikus formák irányába tolódik el az AK-os betegek trombocitáiban és limfocitáiban. Kísérleteink szerint a BChE gén K variánsának polimorfizmusa nem AK specifikus és nincs interakcióban az apoE gén E4-es alléljának öröklésével sem a magyar populációban.
- 3.13.** Eredményeink megerősítették a korábbi adatokat arra vonatkozóan, hogy a IIb típusú hiperlipidémia fokozott BChE enzim aktivitással jár. Elsőként igazoltuk, hogy ez a kapcsolat nem E4-es allél függő.
- 3.14.** A genomikus DNS életkortól független oxidatív károsodását elsőként írtuk le a DK-os személyek limfocitáiban, a sejtek oxidatív stressz indukcióra adott normál repair kapacitása mellett. A DK-os gyermekek limfocitáiban található genomikus DNS szelektív és fokozott oxidatív stressz érzékenységet is kimutattuk.
- 3.15.** Elsőként bizonyítottuk az AK-os betegek limfocitáinak csökkent apoptotikus érzékenységet UVB indukcióra.
- 3.16.** A sejthalállal, az immun folyamatokkal és a noradrenerg rendszer működésével kapcsolatos gének expressziós eltéréseit írtuk le elsőként AK-os betegek limfocitáiban.
- 3.17.** Transzkriptomikai kísérleteink új információkat nyújtottak az imipramin és a citalopram molekuláris hatásmechanizmusáról a KIR-ben. Az első között hívtuk fel a figyelmet az antidepresszívumok kromatin regulációs hatására.
- 3.18.** A TCA imipramin és az SSRI citalopram az AK szempontjából kedvező, az APP szekréciót fokozó hatását mutattuk ki elsőként *in vitro* szövettenyészetes kísérleti rendszerünkben. Adataink szerint a két molekula eltérően hat a celluláris PKC szintekre.
- 3.19.** Elsőként számoltunk be arról, hogy az SSRI csoportba tartozó citaloprammal kezelve AK-os betegeket, a citoszkeletális, immun, sejthalál és túléléssel kapcsolatos gének transzkripcióját változtatta meg a limfocitákban a gyógyszer.
- 3.20.** Elsőként számoltunk be az SNRI hatású venlafaxin transzkriptom szintű hatásairól idős, depressziós betegek limfocitáiban. Korábbi, más antidepresszív hatású vegyületekkel végzett vizsgálatainkhoz hasonlóan, ez a molekula is a kromatin működésében, celluláris szignalizációs és plaszticitási folyamatokban és immunfunkciókban szerepet játszó gének működésére hatott.
- 3.21.** A típusos antipszichotikumok közé tartozó haloperidol, és az atípusos risperidon akut és krónikus transzkriptomikai hatásait vizsgálva a patkányok KIR-ében, a szinaptikus plaszticitásban és a sejt szignalizációs rendszerekben részt vevő gének expressziójának modulációját mutattuk ki. Eredményeink szerint az akut haloperidol kezelés szelektíven

fokozta az APP gén transzkripcióját, az endotelin receptor transzkripcióját pedig mindkét antipszichotikum stimulálta.

3.22. Az APP szintek agyi változásait nyomonkövető kísérleteink szerint csak a haloperidol rövidtávú adagolása emeli meg a kortikális APP mennyiségét; a risperidon nem rendelkezik ilyen jellegű hatásokkal.

3.23. Elsőként bizonyítottuk, hogy az MDMA krónikus adagolása fokozta az APP amiloidogén metabolizmusában központi szerepet játszó BACE enzim mennyiségét és csökkentette a szolubilis APP izoformák arányát a patkányok agykérgében anélkül, hogy az APP transzkripcióját befolyásolta volna. A krónikus morfin kezelés nem okozott ilyen eltéréseket.

3.24. Elsőként vizsgáltuk és bizonyítottuk, hogy a BZD-ek akut és krónikus adagolása nincs hatással az agyi APP szintekre patkányban.

Összefoglalva, a lipid anyagcsere eltéréseit vizsgáló metabolomikai, valamint genomikai és biokémiai vizsgálataink megerősítik azt a nézetet, hogy az AK kialakulása egy rendkívül komplex folyamat és új adatokat nyújtottak ennek megértéséhez. Kísérleteink hozzájárultak a jelenleg is használatos pszichofarmakonok és pszichoaktív szerek hatásmechanizmusának feltérképezéséhez, AK specifikus hatásaik megismeréséhez és új terápiás lehetőségek kidolgozásához.

*Nincs nagyobb csapás,
mint az eleget nem ismerni,
se nagyobb veszély, mint szerzésre
törekedni.
Ezért: aki az eléggel megeléggül,
elégedetnek kell nevezni.*
Lao-ce

5. Az eredmények gyakorlati hasznosíthatósága

- Az AK és más gyakori demencia szindrómák hatékony elsődleges prevenciójához ismernünk kell kialakulásuk patomechanizmusát, valamint környezeti és genetikai rizikótényezőit. A lipid anyagcserével kapcsolatos biokémiai és genetikai vizsgálataink ezek megismeréséhez járultak hozzá.
- A lipid anyagcserével kapcsolatos biokémiai és genomikai vizsgálatok lehetőséget adnak az AK molekuláris szintű jellemzésére, csoportosítására. Kísérletes adataink segíthetnek a demencia spektrumba tartozó betegségek új, nem fenomenológiai jellegű osztályozásának kialakításában.
- Az utóbbi években egy új terápiás irányzat alakult ki, a membrán lipid terápia (Escriba 2006), amely a membránok lipid és nem lipid komponenseinek farmakológiai módosításával igyekszik kezelési stratégiákat kidolgozni, többek között a neurodegeneratív betegségek kezelésére. A lipid anyagcsere AK specifikus eltéréseinek feltérképezésére irányuló kísérleteink új lipid terápiás módszerek kidolgozását segíthetik elő.
- A jelenlegi terápiás lehetőségek korlátait belátva fontos feltérképeznünk a ma használatos pszichofarmakonok hatásmechanizmusát az AK vonatkozásában, azért, hogy csökkenthessük az esetleges káros hatásai rizikóját, és hogy újabb, hatékonyabb molekulákat lehessen tervezni. Nemzetközi viszonylatban is újnak számító adatokról számoltunk be ebben a vonatkozásban.
- A halolaj diéta általunk megfigyelt vazoaktív hatásai is magyarázhatják az n-3 zsírsavak kedvező hatásait az AK vonatkozásában. Eredményeink felhívják a figyelmet terápiás alkalmazásuk előnyeire és veszélyeire is.
- *In vitro* kísérletes adatok bizonyítják, hogy az AChE különböző molekuláris formái eltérő mértékben gátolhatók a ma ismert gátló vegyületekkel. Az a felismerésünk, hogy az AK betegek limfocitái és trombocitái az aszimmetrikus AChE formákból többet tartalmaznak, hatással lehet az eddig is használt ChE gátló gyógyszerek farmakokinetikájának és farmakodinámiájának, valamint hatás és mellékhatás profiljának jobb megértéséhez, és új generációs AChE gátló molekulák tervezéséhez.
- Az a felismerésünk, hogy a szérum lipidszintek és a BChE enzim aktivitása között kapcsolat mutatható ki, segíthet új, hatékonyabb AChE gátló vegyületek tervezésében az AK farmakoterápiája vonatkozásában.

- A UVB indukált apoptózis vizsgálatok eredményei teljesen új AK specifikus farmakoterápiás stratégiák (apoptózis és sejtciklus szabályozás) kidolgozását segíthetik.
- Az AK-os betegek limfocitáinak génexpressziós profiljának feltérképezése több szempontból is újszerűnek minősül. Új transzkriptomikai adatokról számoltunk be az AK perifériás eltéréseinek felismerése és a betegség patomechanizmusának megértése szempontjából. A sejthalállal, immun-folyamatokkal és a noradrenerg rendszer működésével kapcsolatos gének expressziós eltéréseit elsőként írtuk le az AK-os betegek limfocitáiban. Adataink megerősítik azt a feltételezést, hogy egyszerre több patogén folyamat is hozzájárul a neurodegeneráció komplex mechanizmusához.
- Az elsők között hívtuk fel a figyelmet a különböző hatásmechanizmusú antidepresszívumok kromatin regulációs hatására, amely a legújabb kísérletes adatok fényében magyarázhatja a depresszió stressz-elméletét és szubcelluláris neuronális patomechanizmusát. Eredményeink a kromatin regulátor molekulák, mint potenciális új gyógyszerek szerepére hívhatja fel a figyelmet a depresszió és demenciák kezelésében.
- Mivel az immunrendszer szerepét is feltételezik mind a hangulatzavarok, mind az AK kialakításában, ezért az antidepresszívumok genomikus hatásával kapcsolatos eredményeinknek, azaz, hogy ezek a molekulák az immunfunkciókhoz kapcsolt gének expresszióját is modulálják, jelentősége lehet mind az affektív betegségek, mind az AK terápiája és immun-patomechanizmusának megértése szempontjából. Továbbá, kísérleteink transzkriptomikai szinten nyújtottak újabb adatokat az immun- és idegrendszeri folyamatok, és az antidepresszívumok kölcsönhatásainak megértéséhez.
- A nemzetközi viszonylatban is újaknak minősülő transzkriptomikai eredményeink az antipszichotikumok komplex, nem csak a neurotranszmitterek szintjén megnyilvánuló hatását bizonyították és felhívják a figyelmet időskori alkalmazásuk veszélyeire is.
- Elsőként igazoltuk, hogy a BZD-ek nincsenek hatással az agyi APP szintekre, ezért alkalmazásuk ebből a szempontból biztonságosnak valószínűsíthető.
- Vizsgálati eredményeink a különböző pszichofarmakonok és pszichoaktív molekulák új tulajdonságainak és hatásmechanizmusának megismeréséhez, új hatással rendelkező molekulák kifejlesztéséhez és az ismeretlen eredetű AK patomechanizmusának pontosabb megértéséhez járulhatnak hozzá. Hangsúlyozni kívánjuk azonban, hogy nem közvetlenül ezeknek a molekuláknak az anti-demencia szerként való használatára gondolunk (bár ilyen irányú kedvező hatásuk csak erősítheti alkalmazásuk érveit a demenciákhoz társuló viselkedési zavarok kezelésében), hanem vizsgálati eredményeink alapján új támadáspontú molekulák tervezhetők pl. az APP metabolizmusra kifejtett szelektív hatással, vagy a membránok fiziko-kémiai tulajdonságainak megváltoztatásával.

*Ha tudós leszel, sok információd lesz, de a Valóságról semmit sem fogsz tudni.
Mert nem próbálnak meg semmi újat sem.*
Anthony De Mello

6. A tudományos munka önkritikája

Az AK-os betegekkel kapcsolatos vizsgálatainkban az AK klinikai valószínűségi diagnózisának neuropatológiai megerősítésére az esetek többségében nem volt lehetőség, ez csak néhány esetben történt meg.

Az AP-1-es komplexum c-jun vagy c-fos homo- vagy heterodimerekből, vagy c-jun/ATF-2, c-jun/CREB elemek variációiból állhat. Amikor a koleszterin diéta hatását vizsgáltuk az AP-1 és NFκB transzkripciós faktor komplexumok aktivitására nyulak agyi nukleális extraktumaiban, nem volt lehetőségünk olyan EMSA kísérletek elvégzésére, amelyekben a komplexumok más komponenseinek, a c-jun, c-fos, ATF-2 vagy CREB hatásait, interakcióit vizsgálhattuk volna.

A koleszterin etetéses apoB transzgenikus kísérletekben nem határoztuk meg a diéta hatását az agyi koleszterin szintekre, így nem igazoltuk, hogy ez változott volna.

Az apoB-t normál esetben a máj és a belek termelik. Az apoB transzgenikus egerekkel folytatott kísérleteink során nem igazoltuk egyértelműen, hogy az apoB transzgén expresszáldott-e kísérleti állataink agyában. Ennek megfelelően kísérleteink nem válaszolják meg a kérdést, hogy az általunk talált eltérések közvetlenül KIR-i vagy a perifériás apoB hatásoknak köszönhetőek.

A biglikán transzgenikus egerekkel végzett kísérleteink hátránya, hogy ezekkel az állatokkal nem végeztünk koleszterin etetéses kísérleteket. A koleszterin diéta hatását ezért nem tudtuk a biglikán és apoB hatásokkal összevetve vizsgálni az APP gén splicing-jára.

Az apoB transzgenikus állatokhoz hasonlóan, a biglikán transzgenikus egereknél sem határoztuk meg a biglikán agyi expresszióját. Így az általunk megfigyelt eltérésekről sem mondhatók ki egyértelműen, hogy szisztémás, vagy lokális agyi hatások következményei. Biglikán expressziós kísérleteink további hátránya, hogy fehérje szinten nem követtük nyomon a megfigyelt APP mRNS izoforma változásokat.

A trombocita membrán fluiditással kapcsolatos kísérletekben a peroxidatív károsodás mértékét csak a vérplazmában, és nem a membránokban határoztuk meg, pedig az utóbbi jóval informatívabb lett volna a membránok fiziko-kémiai eltérései vonatkozásában, és közvetlenül kapcsolatba lehetett volna hozni a megfigyelt membrán fluiditás változásokkal.

Az AK rizikógén hatások eredményeinek értékelésénél mindig figyelembe kell vennünk, hogy csak az allél specifikus expresszió vizsgálatok eredményei képesek az AK folyamatában zajló finom genetikai hatások feltérképezésére (Singleton és mtsai 2004).

A szubkortikális VD betegek száma alacsony a VD és az apoE gén polimorfizmusának összefüggéseit vizsgáló tanulmányunkban. Ma már minimum 100 fő feletti elemszámú csoportokat használnak hasonló összefüggések vizsgálatára a statisztikai próbák követelményeinek megfelelően.

A szelegilin hatás és az apoE polimorfizmus függőségének vizsgálata során csak a klinikai, kognitív tünetek változásait vizsgáltuk. A szelegilin biológiai, molekuláris hatásait tekintve szerencsésebb lett volna valamilyen OS marker nyomonkövetése is, hiszen a molekula többek között az OS védőhatásáról ismert. Erre azonban vizsgálatunk retrospektív jellege sajnos nem adott lehetőséget.

A kinurenin metabolizmus vizsgálata során csak a KINA, és a szintéziséért felelős enzimek aktivitását vizsgáltuk a neurotoxikus metabolitok (3HK, QUIN) mennyiségét nem mértük, így méréseink nem adtak teljes képet a kinurenin metabolizmusról. Ennek megfelelő a kinurenin metabolizmus általunk leírt eltéréseit sem tudjuk magyarázni komplexitásukban. Nem végeztünk kísérleteket a KINA metabolizmusának (kiválasztás) más irányú feltérképezésére irányában sem. A peroxidatív károsodás mértékét sem határoztuk meg továbbá a vizsgálati személyek vérében, így nem tudtunk közvetlen összefüggéseket keresni a peroxidációs mechanizmusok és a kinurenin metabolizmus viszonylatában.

Az apoD agyi lokalizációjának meghatározására irányuló kísérleteinkben a limitált esetszám és a nagy inter-individuális különbségek miatt nem tudtuk kvantifikálni a morfológiai különbségeket (csak szemikvantitatív Western-blot összehasonlítást végeztünk az AK és KT csoportok összehasonlítására). Az általunk elsőként leírt, a többitől eltérő molekulásúlyú agyi apoD további jellemzésére sem állt módunkban további kísérleteket végezni.

A IIb típusú hiperlipidémia és a szérum ChE aktivitás kapcsolatát vizsgáló tanulmányunkban csak egyféle hiperlipidémia viszonylatában kerestünk összefüggéseket. Pontos kapcsolatot csak a miénknél nagyobb elemszámú vizsgálatban, illetve izolált hiperkoleszterinémia és hipertrigliceridémia elemzésekor deríthetünk fel a változók összefüggéseiről. További metodikai problémája vizsgálatunknak, hogy nem a nemek és korcsoportok szerinti alcsoportokban vizsgáltuk a lipid eltérések és ChE enzimek aktivitásának kapcsolatát, hiszen ezek a faktorok fontos és ismert modifikáló tényezők a szérum lipid és koleszterin szinteknek.

Az UVB hatásának vizsgálata során nem határoztuk meg a T limfociták számát, a besugárzást megelőzően a különböző vizsgálati csoportokban. Ezért nem zárhatjuk ki annak a lehetőségét, hogy az AK-os és KT személyek már alapvetően eltérő T sejt számmal rendelkeztek, és emiatt volt különbség apoptotikus érzékenységükben is. A vizsgálati alanyok között mindkét csoportban kevés volt a férfi (sem az AK, sem a KT csoportban nem volt meg a

2/1-es nő/férfi arány), bár nem ismeretesek adatok arra vonatkozóan, hogy nemi, vagy hormonális különbségek hatással lennének a limfociták apoptotikus fogékonyságára.

A limfociták oxidatív DNS károsodásának vizsgálata során metodikai problémának tekintjük a DK-os gyermekcsoport kicsi elemszámát (7 fő). Azt sem tisztáztuk kísérleteinkben, hogy az egyes limfocita alcsoportok közül melyek, és milyen mértékben károsodtak, és hogy alaptulajdonságaik tekintetében kimutathatóak-e eltérések (pl. funkció zavarok) az általunk vizsgált csoportokban. A mitokondriális DNS-ek oxidatív állapotát sem tisztáztuk, pedig ez a DNS fajta még inkább hajlamos a károsodásra mint a nukleális DNS. A demencia fokát sem mértük fel a felnőtt DK személyek esetében.

Transzkriptomikai vizsgálatainknak számos metodikai problémáját ismerjük és továbbiak is felmerülhetnek a módszer fejlődésével (Bunney és mtsai 2003; Wilson és mtsai 2004; Palotás és Kálmán 2006). A vizsgálatok költségei miatt csak kicsi elemszámokat tudtunk alkalmazni. Ezt a hátrányt a vizsgálati alanyok beválasztásának szigorú feltételeivel próbáltuk áthidalni (homogén csoportok kialakítása, diétás, gyógyszeres faktorok figyelembe vétele, idősök otthona lakói stb.).

Másik fontos szempont, hogy humán transzkriptomikai vizsgálataink nem KIR-i szövetmintákból, hanem perifériás, vérsejtekből, limfocitákból történtek. Ezért eredményeink értékelése során figyelembe kell vennünk, hogy a limfocitákon talált eltérések nem feltétlenül tükrözik a KIR-i folyamatokat. Az idegrendszeri folyamatok összehasonlíthatatlanul komplexebbek, mint egy sejtpopuláció vizsgálata. Másrészt, az egyes limfocita transzkriptomikai eltérésekről, mint biológiai markerekről, nem rendelkezünk szenzitivitási és specificitási adatokkal egyik általunk alkalmazott kísérleti paradigmában sem.

A limfocita transzkriptomikai kísérletek értékelésénél azt a szempontot sem szabad elfelejtenünk, hogy a limfociták nem homogén sejtpopulációt képeznek, és nem vizsgáltuk az egyes alcsoportokat az egyes változókra vonatkoztatva egyik kísérletünkben sem.

További hátrány, hogy transzkriptomikai kísérleteink eredményeinek értékelésekor nem, vagy csak alig tudtuk az epigenetikus faktorok hatására kontrollálni kísérleteinket.

Fontos interpretációs szempont, hogy a DNS lapka kísérleteinket "látszólagos" hipotézis vezéreltséggel terveztük, és kiviteleztek (célzott kérdésfeltevések), ennek ellenére az eredmények interpretálásakor a hipotézis vezéreltséget igyekeztünk eredmény alapú interpretációval kiegészíteni.

A transzkriptomikai eredmények értékelésekor fontos szem előtt tartani, hogy az ilyen típusú kísérletek sajátossága és egyben hátránya nagy variabilitásuk, reprodukálhatóságuk sokszor bizonytalan (Mirnics és mtsai 2006). Szemikvantitatív eredményeinket nem minden esetben validálták a QRT-PCR kísérleteink adatai. Az is probléma, hogy a QRT-PCR validálást

nem mindig a hipotézisek szempontjából legfontosabb változók, hanem gyakran random kiválasztott gének esetében végeztük el. Továbbá, az adatok halmaza többféle interpretációra is módot adhat. Ezeknek a dilemmáknak folyamatosan a tudatában voltunk az eredményeink értékelésekor, és sajnos csak igen kisfokú „teljességre” tudtunk törekedni.

A DNS lapka technika az utóbbi 3 évben végzett kísérleteink alatt rengeteget fejlődött. Az egy kísérletben vizsgált gének száma ma már akár a harmincezret is elérheti (Bunney és mtsai 2003). Mi kezdetben csak 3 ezer, majd később 9 ezer gént tudtunk vizsgálni. Az adatok kiértékeléséhez is egyre bonyolultabb, specializált számítógépes statisztikai programokat használnak és követelnek meg (Verducci és mtsai 2006).

Mirnic és mtsai (2006) a pszichiátriai transzkriptomikai vizsgálatok metodikai nehézségeit, problémáit tárgyalva hívják fel a figyelmet a „molekuláris hub”-ok lehetőségére, azaz olyan géncsoportokra, amelyek expressziója egyszerre és hasonlóan változik, betegség, vagy paradigma specifikusan. Tudatában vagyunk, hogy ezek a „hub”-ok a pszichofarmakonok hatásainak vizsgálatakor is jelen lehetnek eredményeinkben. Transzkriptomikai eredményeink ezért ebből a szempontból is további validációs kísérleteket igényelnek, és követelnek meg.

Ahogy korábban is említettem, de ismételten szeretném hangsúlyozni, hogy kísérleteink igen fontos hátránya, hogy az expressziós adatokat csak kisszámú random választott gének esetében tudtuk QRT-PCR segítségével megerősíteni, és ezek esetében sem volt 100%-os a validitási arány. A meglévő találati arányt további kereszt-hibridizációs problémák is bonyolíthatták.

Az is ismert, hogy a DNS lapka transzkriptomikai vizsgálatok egyik igen komoly metodológiai problémája, hogy a kis elemszámban előforduló gének transzkripciójára nem igazán érzékeny a módszer. Ezért vizsgálataink esetében számolnunk kell azzal a lehetőséggel is, hogy ezekre a génekre egyáltalán nem informatívak kísérleteink.

Az antipszichotikumok hatásait vizsgáló APP immunoblot kísérleteinkben használt monoklonális ellenanyag nem képes megkülönböztetni az egyes APP izoformákat, ezért az amiloidogén és nem amiloidogén peptidek arányait és mennyiségét nem tudtuk meghatározni kísérleteinkben.

A pszichofarmakonok (antidepresszívumok és antipszichotikumok, anxiolitikumok, addiktív szerek) KIR-i, APP transzkripcióra és metabolizmusra kifejtett hatását vizsgáló kísérleteink csak protein és transzkriptom szinten vizsgálták az említett kérdéseket. Eredményeink ezért nem zárják ki annak lehetőségét, hogy ezek a pszichofarmakonok az amiloid anyagcsere más szintjein, pl. aggregáció, lízis, toxicitás, plakk kialakulás, NFF kialakulás, fejtik ki hatásukat.

Az MDMA és morfin, APP és BACE kortikális szintekre kifejtett hatásának

vizsgálatakor, az általunk használt poliklonális BACE ellenanyag nem különböztette meg az 1-es és 2-es BACE izoformákat, így csak az összmenyiség változásait tudtuk mérni. Az APP mennyiségi vizsgálatára használt monoklonális ellenanyag pedig az amiloidogén és nem amiloidogén APP formák elkülönítésére nem volt alkalmas. Ezért kísérleteink nem adtak egyértelmű választ arra vonatkozóan, hogy az MDMA az amiloidogén vagy nem amiloidogén APP metabolizmusra hat. További metodikai probléma, hogy csak egyetlen MDMA és morfin dózissal végeztük krónikus kísérleteinket, ezért nem zárhatjuk ki annak lehetőségét, hogy más dózisokat alkalmazva eredményeinktől eltérő jellegű hatásokat figyelhettünk volna meg.

A BZD-ek APP szinteket módosító hatását vizsgálva szintén nem tudtuk az amiloidogén és nem amiloidogén APP metabolitokat elkülöníteni, így nem tudunk választ adni arra a kérdésre, hogy a BZD-ek amiloidogén hatásúak-e, vagy sem? Az APP transzkripcióra kifejtett hatásukat sem vizsgáltuk.

Aki tudja
dicsőségét, mégis őrzi rejtettségét;
völgy a világon,
Aki völgy a
világon,
erény-ben lesz
tökéletes,
egyszerű és természetes.
Lao-ce

7. A tézisek anyagát képező közlemények jegyzéke

1. **Kálmán J**, Gecse Á, Farkas T, Joó F, Telegdy Gy, Lajtha A. Dietary manipulation with high marine fish oil intake of fatty acid composition and arachidonic acid metabolism in rat cerebral microvessels. *Neurochem. Res.* 1992; 17: 167-72.
2. **Kálmán J**, Dey I, Szöllősiné Varga I, Matkovics B, Brown B, Janka Z, Farkas T, Joó J. Platelet membrane fluidity and plasma malondialdehyde levels in Alzheimer's demented patients with and without family history of dementia. *Biol. Psychiat.* 1994; 35: 190-4.
3. **Kálmán J**, Janka Z. Az apolipoprotein E4 allél mint genetikai rizikótényező Alzheimer betegségben. *Clin. Neurosci./Ideggy. Szle.* 1996a; 49: 321-8.
4. **Kálmán J**, Juhász A, Császár A, Kanka A, Maglóczky E, Bencsik K, Janka Z, Raskó I. Apolipoprotein polimorfizmus Alzheimer demenciában. *Psychiat. Hung.* 1996b; 11: 433-7.
5. **Kálmán J**, Juhász A, Császár A, Kanka A, Maglóczky E, Bencsik K, Janka Z, Raskó I. Apolipoprotein E allele frequencies in patients with late-onset Alzheimer's disease in Hungary. *Acta Neurol. Scand.* 1997; 95: 56-9.
6. McConathy WJ, Lackó AG, **Kálmán J**. Senile dementia and apolipoprotein E4. *Dementia* 1997; 8: 258.
7. **Kálmán J**, Juhász A, Császár A, Kanka A, Rimanóczy Á, Janka Z, Raskó I. Increased apolipoprotein E4 allele frequency is associated with vascular dementia in the Hungarian population. *Acta Neurol. Scand.* 1998; 98: 166-8.
8. **Kálmán J**, Kudchodkar BJ, Murray K, McConathy WJ, Juhász A, Janka Z, Lackó AG. Evaluation of serum lipid related cardiovascular risk factors in Alzheimer's disease. *Demen. Geriatr. Cogn.* 1999; 10: 488-93.
9. Csapó Á, **Kálmán J**, Juhász A, Raskó I, Janka Z. Apolipoprotein E genotípus vizsgálata expresszív beszédfejlődési zavarban. *Pediáter* 1999; 8: 224-7.
10. **Kálmán J**, McConathy WJ, Araoz C, Kása P, Lackó AG. Apolipoprotein D in the aging brain and in Alzheimer's dementia. *Neurol. Res.* 2000a; 22: 330-6.
11. **Kálmán J**, Hódosi K, Janka Z. Apoptosis Alzheimer-kórban. *Neuropsychopharmacol. Hung.* 2000b; 2: 125-37.
12. **Kálmán J**, Kudchodkar BJ, Krishnamoorthy R, Dory L, Lackó AG, Agarwal N. High cholesterol diet down regulates the activity of activator protein-1 but not nuclear factor-kappa B in rabbit brain. *Life Sci.* 2001; 68: 1495-503.

13. **Kálmán J**, Juhász A, Rimanóczy Á, Palotás A, Palotás M, Szabó Z, Boda K, Márki-Zay J, Janka Z. Lack of influence of the apolipoprotein E genotype on the outcome of selegiline treatment in Alzheimer's disease. *Demen. Geriatr. Cogn.* 2003; 16: 31-4.
14. Palotás A, Pákáski M, Palotás M, Hugyecz M, Molnár J, Penke B, Janka Z, **Kálmán J**. Effect of haloperidol and risperidone on amyloid precursor protein levels in vivo. *Brain Res. Bull.* 2003a; 62: 93-9.
15. Palotás M, Palotás A, Pákáski M, Hugyecz M, Janka Z, Penke B, **Kálmán J**. Antidepresszívumok hatása az amyloid prekursor protein metabolizmusára patkány agyban. *Neuropsychopharmacol. Hung.* 2003b; 5: 133-7.
16. **Kálmán J**, Juhász A, Rakonczay Z, Ábrahám Gy, Boda K, Farkas T, Penke B, Janka Z. Increased serum butyrylcholinesterase activity in type *IIb* hyperlipidaemic patients. *Life Sci.* 2004a; 75: 1195-204.
17. **Kálmán J**, Juhász A, Rakonczay Z, Ábrahám Gy, Boda K, Farkas T, Penke B, Janka Z. Serum butyrylcholinesterase activity in hyperlipidaemia. *Atherosclerosis* 2004b; 173: 145-6.
18. Palotás M, Palotás A, Puskás GL, Kitajka K, Pákáski M, Janka Z, Molnár J, Penke B, **Kálmán J**. Gene expression profile analysis of the rat cortex following treatment with imipramine and citalopram. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 2004a; 7: 401-13.
19. Palotás A, Puskás GL, Kitajka K, Palotás M, Molnár J, Pákáski M, Janka Z, Penke B, **Kálmán J**. The effect of citalopram on gene expression profile of Alzheimer lymphocytes. *Neurochem. Res.* 2004b; 29: 1563-70.
20. Palotás A, Puskás G.L, Kitajka K, Palotás M, Molnár J, Pákáski M, Janka Z, Penke B, **Kálmán J**. Altered response to mirtazapine on gene expression profile of lymphocytes from Alzheimer's patients. *Eur. J. Pharmacol.* 2004c; 497: 247-54.
21. Juhász A, Palotás A, Janka Z, Rimanóczy A, Palotás M, Bódi N, Boda K, Zana M, Vincze G, **Kálmán J**. ApoE -491A/T promoter polymorphism is not an independent risk factor, but associated with the epsilon4 allele in Hungarian Alzheimer's dementia population. *Neurochem. Res.* 2005a; 30: 591-6.
22. Juhász A, Rimanóczy A, Boda K, Vincze G, Szilávik G, Zana M, Bjelik A, Pákáski M, Bódi N, Palotás A, Janka Z, **Kálmán J**. CYP46 T/C polymorphism is not associated with Alzheimer's dementia in a population from Hungary. *Neurochem. Res.* 2005b; 30: 943-8.
23. **Kálmán J**, Janka Z. Koleszterin és Alzheimer-kór. *Orv. Hetil.* 2005a; 146: 1903-11.
24. Rakonczay Z, Horváth Z, Juhász A, **Kálmán J**. Peripheral cholinergic disturbances in Alzheimer's disease. *Chem. Biol. Interact.* 2005; 157-158: 233-8.
25. **Kálmán J**, Kitajka K, Pákáski M, Zvara A, Juhász A, Vincze G, Janka Z, Puskás GL. Gene expression profile analysis of lymphocytes from Alzheimer's patients. *Psychiatr. Genet.* 2005b; 15: 1-6.
26. Zana M, Juhász A, Rimanóczy A, Bjelik A, Baltás E, Ocsóvszki I, Boda K, Penke B, Dobozy A, Kemény L, Janka Z, **Kálmán J**. Alzheimer's lymphocytes are resistant to ultraviolet B-induced apoptosis. *Neurobiol. Aging* 2006; 27: 831-4.

27. Fehér LZ, **Kálmán J**, Puskás GL, Gyulveszi G, Kitajka K, Penke B, Palotás M, Samarova EI, Molnár J, Zvara A, Matin K, Bódi N, Hugyecz M, Pákáski M, Bjelik A, Juhász A, Bogáts G, Janka Z, Palotás A. Impact of haloperidol and risperidone on gene expression profile in the rat cortex. *Neurochem. Int.* 2005; 47: 271-80.
28. Pákáski M, Bjelik A, Hugyecz M, Kása P, Janka Z, **Kálmán J**. Imipramine and citalopram facilitate amyloid precursor protein secretion in vitro. *Neurochem. Int.* 2005; 47: 190-5.
29. Palotás M, Palotás A, Bjelik A, Pákáski M, Hugyecz M, Janka Z, **Kálmán J**. Effect of general anesthetics on amyloid precursor protein and mRNA levels in the rat brain. *Neurochem. Res.* 2005; 30: 1021-6.
30. **Kálmán J**, Palotás A, Juhász A, Rimanóczy A, Hugyecz M, Kovács Z, Galsi G, Szabó Z, Pákáski M, Fehér LZ, Janka Z, Puskás GL. Impact of venlafaxine on gene expression profile in lymphocytes of the elderly with major depression – evolution of antidepressants and the role of the "neuro-immune" system. *Neurochem. Res.* 2005c; 30: 1429-38.
31. Bjelik A, Bereczki E, Gonda Sz, Juhász A, Rimanóczy Á, Zana M, Csont T, Pákáski M, Boda K, Ferdinandy P, Dux L, Janka Z, Sántha M, **Kálmán J**. Human apoB overexpression and a high-cholesterol diet differently modify the brain APP metabolism in the transgenic mouse model of atherosclerosis. *Neurochem. Int.* 2006a; 49: 393-400.
32. Bjelik A, Pákáski M, Bereczki E, Gonda Sz, Juhász A, Rimanóczy Á, Zana M, Boda K, Janka Z, Sántha M, **Kálmán J**. APP mRNA splicing is upregulated in the brain of biglycan transgenic mice. *Neurochem. Int.* 2006b (in press).
33. **Kálmán J**, Bjelik A, Hugyecz M, Timár J, Gyarmati Z, Zana M, Fürst Zs, Janka Z, Rakonczay Z, Horváth Z, Pákáski M. 3,4-Methylenedioxymethamphetamine (MDMA), but not morphine, alters APP processing in the rat brain. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 2006a; 17: 1-8.
34. Zana M, Janka Z, **Kálmán J**. Oxidative stress: a bridge between Down's syndrome and Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* 2006a; (Published online Apr 17).
35. Zana M, Szécsényi A, Czibula Á, Bjelik A, Juhász A, Rimanóczy Á, Szabó Sz, Vetró Á, Szücs P, Várkonyi Á, Pákáski M, Boda K, Raskó I, Janka Z, **Kálmán J**. Age-dependent oxidative stress-induced DNA damage in Down's lymphocytes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2006b; 345: 726-33.
36. Hartai Zs, Juhász A, Rimanóczy Á, Janáky T, Klivényi P, Dux L, Penke B, Janka Z, **Kálmán J**. Alzheimer's disease: alterations in kynurenine metabolism in the blood are not related to apolipoprotein E genotype. *Neurochem. Int.* 2006 (in press).
37. Palotás A, **Kálmán J**. Candidate susceptibility genes in Alzheimer's disease are at high risk for being forgotten – They don't give peace of mind... *Curr. Drug Metab.* 2006; 7: 273-93.
38. **Kálmán J**, Palotás M, Pákáski M, Hugyecz M, Janka Z, Palotás A. Unchanged rat brain amyloid precursor protein levels after exposure to anesthetic benzodiazepines *in vivo*. *Eur. J. Anaesthesiol.* 2006b; 23: 772-5.

Ezért a bölcs
vigyáz az emberekre,
senkit meg nem vetve;
ügyel a létezőkre,
semmit el nem vetve.
Ez a kétszeres világosság.
A jó a rossznak tanítója,
a rossz a jónak támasztója.
Ha nem becsülik tanítóikat,
ha nem szeretik támasztóikat:
olyan a legbölcsebb, mint a
legvekkabb.
Íme a legmélyebb és
legsúlyosabb.
Lao-ce

8. Köszönetnyilvánítás és az elnyert tematikus kutatási pályázatok listája

Tanítómestereimnek tartom és büszke vagyok rá, hogy ismerhetem őket: †*Joó Ferenc* (MTA Szegedi Biológiai Központ Biofizikai Intézet), †*Farkas Tibor* (MTA Szegedi Biológiai Központ Biokémiai Intézet), *Szilárd János* (SZTE Pszichiátriai Klinika), *Janka Zoltán* (SZTE Pszichiátriai Klinika), †*Vargha Miklós* professzor (SZTE Pszichiátriai Klinika), *Szentistványi István* (SZTE Pszichiátriai Klinika), *Engelhardt József* (SZTE Neurológiai Klinika), *Penke Botond* (SZTE Orvosi Vegytani Intézet) tanszékvezető egyetemi tanárokat és professzorokat, valamint *Dux Ernő* tudományos főmunkatársat (MTA Szegedi Biológiai Központ Biofizikai Intézet). Tudományos szemléletet, szeretetet, alázatot, tisztességet és türelmet tanultam példájukból, munkájukból a tárgyi tudás mellett, amellyel felvérteztek. Életük, munkájuk példaként szolgál számomra folyamatosan.

Köszönettel tartozom külföldi tanítómestereimnek: *William Parry-Jones* (Department of Child and Adolescent Psychiatry, University of Glasgow, Scotland), *Stanley Appel* (Department of Neurology, Baylor University, Houston, Texas, USA), *András G. Lackó* (Departments of Molecular Biology and Immunology, University of North Texas Health Science Center, Fort Worth, Texas, USA), *Walter McConathy* (Department of Internal Medicine, University of North Texas Health Science Center, Fort Worth, Texas, USA, professzoroknak, akik külföldi ösztöndíjaim alatt elviselték honvágyam, egyengették tartózkodásom nehézségeit és számomra emlékezetes szigorral ellenőrizték és segítették munkámat.

Közvetlen munkatársaimnak tekintem: *Juhász Anna*, *Pákáski Magdolna*, *Rimanóczy Ágnes*, *Boda Krisztina*, *Zana Marianna*, *Palotás András*, *Bjelik Annamária*, *Rakonczay Zoltán*, *Sántha Miklós*, *Maglóczy Erzsébet* és *Puskás László* kollégákat, akikkel folyamatosan gyúrtuk, alakítottuk egymást, és a munkát, célkitűzéseket a laboratóriumi és klinikai munka minden örömével és bánatával.

A közös közleményekben szereplő munkatársak és együttműködő partnerek (névsorban), akik az értekezésben említésre került vizsgálatokban munkájukkal részt vettek: Ábrahám György, Baltás Eszter, Bari Ferenc, Barzó Pál, Bencsik Krisztina, Bereczki Erika, Bhalachandra J. Kudchodkar, Bjelik Annamária, Boda Krisztina, Boncz István, Araoz Carlos, Czibula Ágnes, Császár Albert, Csibri Éva, Csont Tamás, Dobozy Attila, Doma Eszter, Domoki Ferenc, Donkó Teodóra, Ladislav Dory, Dux László, Fehér László, Ferdinandy Péter, Fürst Zsuzsanna, Galsi Gabriella, Gecse Árpád, Gonda Szilvia, Gyarmati Zoltán, Hartai Zsuzsanna, Horváth Zoltán, Hugyeczi Marietta, Janka Zoltán, Janáky Tamás, Járdánházy Tamás, Juhász Anna, Kanka Andor, Kása Péter, Kemény Lajos, Kenderessy Szabó Anna, Klivényi Péter, Kiss Erika, Kitajka Klára, Kovács Zoltán Ambrus, Lackó András Gábor, Maglóczy Erzsébet, Márki-Zay János, Molnár József, Murray Kathrine, Neeraj Agarwal, Ocsosvski Imre, Pákáski Magdolna, Palotás András, Palotás Miklós, Papp Gyula, Penke Botond, Raskó István, Puskás G. László, Raghu Krishnamoorthy, Rakonczay Zoltán, Rimanóczy Ágnes, Rudas László, Sántha Anna, Sántha Miklós, Szabó Zoltán, Szabó Szilvia, Szakács Réka, Szlávik Győző, Szili-Török Tamás, Szécsényi Anita, Szűcs Péter, Varga Ilona, Telegdy Gyula, Tímár Júlia, Tóth Gábor, Vetró Ágnes, Vécsei László, Vincze Gábor, Walter McConathy, Zana Marianna, Zvara Ágnes voltak.

Az adminisztratív munkákban végzett témérdek segítségükért Dobó Sándorné (Margó), Dobos Nikoletta, Csonka Petra és Novák Jenőné érdemel igen nagy hálát és köszönetet.

A doktori értekezésben említett tudományos kutatásokhoz szükséges anyagi forrásokat kutatási támogatások tették lehetővé, amelyekben közreműködő partnerként, vagy témavezetőként vettem részt. Köszönetem szeretném ezért kifejezni a magyar állami intézményeknek (ETT, OTKA, MKM, FKFP, RET), bizottságoknak és a pályázatok elbírálóinak a következő pályázatokban való részvételemért:

ETT 106/90(1991-1993, 3 év): „A dementiák epidemiológiai és klinikai vizsgálata”

ETT T 04-589/93 (1994-1996, 3 év): „A dementia epidemiológiai és klinikai vizsgálata”

MKM 228 (1996, 1 év): „Kvantitatív EEG mapping vizsgálatok pszichiátriai betegségekben”

ETT 580/1996 04 (1990-1993, 3 év): „Klinikai vizsgálatok különböző eredetű dementiákban”

FKFP 0092/1997 (1997-2001, 4 év): „Neuropszichiátriai és biokémiai vizsgálatok Alzheimer dementiában”

1997 Eli Lilly/WFSBP International Research Development Award

OTKA T 025160 (1998-2001, 4 év): „Neuropszichológiai vizsgálatok schizophrenia spektrumban: elméleti és gyakorlati alkalmazás”

ETT 01807/2000 (2000-2002, 3 év): „Molekuláris biológiai vizsgálatok Alzheimer demenciában”

Békésy ösztöndíj (2002-2005)

ETT IV/93 (2003-2005, 3 év): „Molekuláris és farmakogenetikai vizsgálatok dementiában, szkizofréniában és depresszióban”

OTKA T 046452 (2004-2007, 4 év): „Pszichiátriai betegségek kezelésének és biológiai hátterének farmakodinamikai és molekuláris genetikai vizsgálata”

ETT 3/2000 (2000-2002, 2 év): „A primér nociceptív neuron NGF-c-jun-BDNF rendszere: a krónikus fájdalom neurogenetikai alapjai”

OTKA T0 38346, (2002-2005, 4 év): „Perifériás markerek jelentősége az Alzheimer-kór diagnosztikájában és terápiájában”

ETT 257/2003, (2003-2005, 3 év): „Lipid anyagcsere és kolinerg eltérések vizsgálata hiperlipidémiában és dementiákban”

OTKA T143418 (2003-2006, 4 év) „Gyógyszeres terápia által indukált amyloid prekursor protein metabolizmus és amyloid képződés változásának vizsgálata *in vitro* és *in vivo*”

RET pályázat, 2004-2008, Délalföldi Neurobiológiai Tudásközpont

OTKA 5K526 (2006-2009, 4 év) „Az Alzheimer-kór rizikógénjeinek keresése és ismert rizikógének összehasonlító vizsgálata hazai roma és nem roma populációkban”

Köszönetet szeretnék mondani a *Janssen-Cilag*, *Eli Lilly*, *Wyeth*, *Organon*, *Egis*, *Chinoin*, *Novartis*, *Lundbeck*, *GlaxoSmithKline*, *TEVA* gyógyszergyáraknak, akik egyes kutatási projektjeinket közvetlenül is támogatták.

Köszönet illeti az *Innovatív Gyógyszergyártók Szövetségét*, mivel pályázatukkal és az elnyert első helyezésünkkel járó anyagi díjjal jelentősen hozzájárultak farmakológiai kísérleteink sikereihez.

A tisztelet
a hűség és bizalom hiánya,
a zűrzavar kezdete.
A külső tudás
az út virága,
a belső tudatlanság kezdete.
Ezért az igaz ember
a valódit akarja és nem a
látszót,
a gyümölcsöt akarja és nem a
virágot,
a közelit akarja és nem a
távolit.
Lao-ce

9. Irodalomjegyzék

- Ader R, Felten DL, Cohen N. *Psychoneuroimmunology* 2nd ed. 1991. Academic Press, New York.
- Ahmad M, Theofanidis P, Medford RM. Role of activating protein-1 in the regulation of the vascular cell adhesion molecule-1 gene expression by tumor necrosis factor- α . *J. Biol. Chem.* 1998; 273: 4616-21.
- Alvarez-Arcaya A, Combarros O, Llorca J, Sanchez-Guerra M, Berciano J, Fernandez-Luna JL. The -491 TT apolipoprotein E promoter polymorphism is associated with reduced risk for sporadic Alzheimer's disease. *Neurosci. Lett.* 2001; 304: 204-8.
- Andrews NC, Faller DV. A rapid micropreparation technique for extraction of DNA-binding proteins from limiting numbers of mammalian cells. *Nucleic Acids Res.* 1991; 19: 2499.
- Annapurna V, Senciall I, Davis AJ, Kutty, KM. Relationship between serum pseudocholinesterase and triglycerides in experimentally induced diabetes mellitus in rats. *Diabetologia* 1991; 34: 320-4.
- Appleyard ME, McDonald B, Benjamin L. Presence of a soluble form of acetylcholinesterase in human ocular fluids. *Br. J. Ophthalmol.* 1991; 75: 276-9.
- Arendt T. Synaptic plasticity and cell cycle activation in neurons are alternative effector pathways: the 'Dr. Jekyll and Mr. Hyde concept' of Alzheimer's disease or the yin and yang of neuroplasticity. *Prog. Neurobiol.* 2003; 71: 83-248.
- Arjona AA, Pooler AM, Lee RK, Wurtman, RJ. Effect of a 5-HT(2C) serotonin agonist, dexnorfenfluramine, on amyloid precursor protein metabolism in guinea pigs. *Brain Res.* 2002; 951: 135-40.
- Arnold SE, Franz BR, Trojanowski JQ. Elderly patients with schizophrenia exhibit infrequent neurodegenerative lesions. *Neurobiol. Aging* 1994; 15: 299-303.
- Artiga MJ, Bullido MJ, Sastre I, Recuero M, Garcia MA, Aldudo J, Vazquez J, Valdivieso F. Allelic polymorphisms in the transcriptional regulatory region of apolipoprotein E gene. *FEBS Lett.* 1998; 421: 105-8.
- Asakura M, Miyamoto S, Sasuga Y. Protein phosphorylation involved in the mechanism of antidepressant drugs. *Eur. Neuropsychopharmacol.* 1996; 6: 156.
- Atack JR, Perry EK, Bonham JR, Perry RH, Tomlinson BE, Blessed G, Fairbairn A. Molecular forms of acetylcholinesterase in senile dementia of Alzheimer type: selective loss of the intermediate (10S) form. *Neurosci. Lett.* 1983; 40: 199-204.
- Atkinson J. Cerebrovascular structure and dementia: new drug targets. *Trends Pharmacol. Sci.* 2001; 12: 630-5.
- Aune TM, Kelley KA, Ranges GE, Bombara MP. Serotonin-activated signal transduction via serotonin receptors on Jurkat cells. *J. Immunol.* 1990; 145: 1826-31.
- Avent KM, Usuki E, Eyles DW, Kieve R, Van der Schyf CJ, Castagnoli N Jr, Pond SM. Haloperidol and its tetrahydropyridine derivative (HPTP) are metabolized to potentially neurotoxic pyridium species in the baboon. *Life Sci.* 1996; 59: 1473-82.
- Balbin M, Freije JM, Fueyo A, Sanchez LM, Lopez-Otin C. Apolipoprotein D is the major protein component in cyst fluid from women with human breast gross cystic disease. *Biochem. J.* 1990; 271: 803-7.
- Baldwin AS, Jr. The NF-kappa B and I kappa B proteins: new discoveries and insights. *Annu. Rev. Immunol.* 1996; 14: 649-83.
- Bales KR, Verina T, Dodel RC, Du, Y., Altstiel L, Bender M, Hyslop P, Johnstone EM, Little SP, Cummins DJ, Piccardo P, Ghetti B, Paul SM. Lack of apolipoprotein E dramatically reduces amyloid beta-peptide deposition. *Nat. Genet.* 1997; 17: 263-4.
- Baran H, Jellinger K, Deicke L. Kynurenine metabolism in Alzheimer's disease. *J. Neural. Transm.* 1999; 106: 165-81.
- Beffert U, Poirier J. Apolipoprotein E, plaques, tangles and cholinergic dysfunction in Alzheimer's disease. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1996; 777: 166-74.
- Behl C, Lezoualc'h F, Widmann M, Rupprecht R, Holsboer F. Oxidative stress-resistant cells are protected against haloperidol toxicity. *Brain Res.* 1996; 717: 193-5.
- Bellinger DL, Felten SY, Felten DL. Maintenance of noradrenergic sympathetic innervation in the involuted thymus of the aged Fisher 344 rat. *Brain Behav. Immunol.* 1988; 2: 133-50.

- Bergem AL, Engedal K, Kringlen E. The role of heredity in late-onset Alzheimer disease and vascular dementia. A twin study. *Arch. Gen. Psychiatry* 1997; 54: 264-70.
- Bergman M, Salman H, Beloosesky Y, Djaldetti M, Bessler H. Are peripheral blood cells from patients with Alzheimer's disease more sensitive to apoptotic stimuli? *Alzheimer Dis. Assoc. Disord.* 2002; 16: 156-60.
- Bigl M, Apelt J, Lushekina EA, Lange-Dohna C, Rossner S, Schliebs R. Expression of beta-secretase mRNA in transgenic Tg2576 mouse brain with Alzheimer plaque pathology. *Neurosci. Lett.* 2000; 292: 107-10.
- Bjorkhem I, Lutjohann D, Breuer O, Sakinis A, Wennmalm A. Importance of a novel oxidative mechanism for elimination of brain cholesterol. Turnover of cholesterol and 24(S)-hydroxycholesterol in rat brain as measured with $^{18}\text{O}_2$ techniques in vivo and in vitro. *J. Biol. Chem.* 1997; 272: 30178-84.
- Bjorkhem I, Lutjohann D, Diczfalusy U, Stahle L, Ahlborg G, Wahren J. Cholesterol homeostasis in human brain: turnover of 24S-hydroxycholesterol and evidence for a cerebral origin of most of this oxysterol in the circulation. *J. Lipid Res.* 1998; 39: 1594-1600.
- Bogatcheva NV, Sergeeva MG, Dudek SM, Verin AD. Arachidonic acid cascade in endothelial pathobiology. *Microvasc. Res.* 2005; 69: 107-27.
- Bogdanovic N, Bretillon L, Lund EG, Diczfalusy U, Lannfelt L, Winblad B, Russell DW, Bjorkhem I. On the turnover of brain cholesterol in patients with Alzheimer's disease. Abnormal induction of the cholesterol-catabolic enzyme CYP46 in glial cells. *Neurosci. Lett.* 2001; 314: 45-8.
- Bohnen NI, Warner MA, Kokmen E, Beard CM, Kurland LT. Alzheimer's disease and cumulative exposure to anesthesia: a case-control study. *J. Am. Geriatr. Soc.* 1994; 42: 198-201.
- Borroni B, Archetti S, Agosti C, Akkawi N, Brambilla C, Caimi L, Caltagirone C, Di Luca M, Padovani A. Intronic CYP46 polymorphism along with ApoE genotype in sporadic Alzheimer Disease: from risk factors to disease modulators. *Neurobiol. Aging* 2004; 25: 747-51.
- Boston PF, Bennett A, Horrobin DF, Bennett CN. Ethyl-EPA in Alzheimer's disease--a pilot study. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* 2004; 71: 341-6.
- Bouillot C, Prochiantz A, Rougon G, Allinquant B. Axonal amyloid precursor protein expressed by neurons in vitro is present in a membrane fraction with caveolae-like properties. *J. Biol. Chem.* 1996; 271: 7640-4.
- Boyles JK, Pitas RE, Wilson, E, Mahley, RW, Taylor JM. Apolipoprotein E associated with astrocytic glia of the central nervous system and with nonmyelinating glia of the peripheral nervous system. *J. Clin. Invest.* 1985; 76: 1501-13.
- Boyles JK, Notterpek LM, Anderson LJ. Accumulation of apolipoproteins in the regenerating and remyelinating mammalian peripheral nerve. Identification of apolipoprotein D, apolipoprotein A-IV, apolipoprotein E, and apolipoprotein A-I. *J. Biol. Chem.* 1990; 265: 17805-15.
- Bowen DM, Allen SJ, Benton JS, Goodhardt MJ, Haan EA, Palmer AM, Sims NR, Smith CC, Spillane JA, Esiri MM, Neary D, Snowden JS, Wilcock GK, Davison AN. Biochemical assessment of serotonergic and cholinergic dysfunction and cerebral atrophy in Alzheimer's disease. *J. Neurochem.* 1983; 41: 266-72.
- Breslow JL. Mouse models of atherosclerosis. *Science* 1996; 272: 685-8.
- Breteler MM, van Duijn CM, Chandra V, Fratiglioni L, Graves AB, Heyman A, Jorm AF, Kokmen E, Kondo K, Mortimer JA. Medical history and the risk of Alzheimer's disease: a collaborative re-analysis of case-control studies. EURODEM Risk Factors Research Group. *Int. J. Epidemiol.* 1991; 20: 36-42.
- Breteler MM, Bots ML, Ott A, Hofman A. Risk factors for vascular disease and dementia. *Haemostasis* 1998; 28: 167-73.
- Bretillon L, Lutjohann D, Stahle L, Widhe T, Bindl L, Eggertsen G, Diczfalusy U, Bjorkhem I. Plasma levels of 24S-hydroxycholesterol reflect the balance between cerebral production and hepatic metabolism and are inversely related to body surface. *J. Lipid Res.* 2000; 41: 840-5.
- Bretsky P, Guralnik JM, Launer L, Albert M, Seeman TE. MacArthur Studies of Successful Aging. The role of APOE-epsilon4 in longitudinal cognitive decline: MacArthur Studies of Successful Aging. *Neurology* 2003; 60: 1077-81.
- Bronfman FC, Soto C, Tapia L, Tapia V, Inestrosa NC. Extracellular matrix regulates the amount of the beta-amyloid precursor protein and its amyloidogenic fragments. *J. Cell Physiol.* 1996; 166: 360-9.
- Brown MS, Goldstein JL. A receptor-mediated pathway for cholesterol homeostasis. *Science* 1986; 232: 34-47.
- Brown WR, Moody DM, Tytell M, Ghazi-Birry HS, Challa VR. Microembolic brain injuries from cardiac surgery: are they seeds of future Alzheimer's disease? *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1997; 826: 386-9.
- Brugger B, Sandhoff R, Wegehingel S, Gorgas K, Malsam J, Helms JB, Lehmann WD, Nickel W, Wieland FT. Evidence for segregation of sphingomyelin and cholesterol during formation of COPI-coated vesicles. *J. Cell Biol.* 2000; 151: 507-18.
- Buege JA, Aust SD. Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol.* 1978; 52: 302-10.
- Bullido MJ, Artiga MJ, Recuero M, Sastre I, Garcia MA, Aldudo J, Lendon C, Han SW, Morris JC, Frank A, Vazquez J, Goate A, Valdivieso F. A polymorphism in the regulatory region of APOE associated with risk for Alzheimer's dementia. *Nat. Genet.* 1998; 18: 69-71.
- Bunney WE, Bunney BG, Vawter MP, Tomita H, Li J, Evans

- SJ, Choudary PV, Myers RM, Jones EG, Watson SJ, Akil H. Microarray technology: a review of new strategies to discover candidate vulnerability genes in psychiatric disorders. *Am. J. Psychiatry* 2003; 160: 657-66.
- Burgut FT, Benaour M, Hencliffe C. Late-life depression: a neuropsychiatric approach. *Expert. Rev. Neurother.* 2006; 6: 65-72.
- Buxbaum JD, Oishi M, Chen HI, Pinkas-Kramarski R, Jaffe EA, Gandy SE, Greengard P. Cholinergic agonists and interleukin 1 regulate processing and secretion of the Alzheimer beta/A4 amyloid protein precursor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1992; 89: 10075-8.
- Buxbaum JD, Cullen EI, Friedhoff LT Pharmacological concentrations of the HMG-CoA reductase inhibitor lovastatin decrease the formation of the Alzheimer beta-amyloid peptide in vitro and in patients. *Front. Biosci.* 2002; 7: 50-9.
- Callow MJ, Stoltzfus LJ, Lawn RM, Rubin EM. Expression of human apolipoprotein B and assembly of lipoprotein(a) in transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1994 91: 2130-4.
- Calon F, Lim GP, Yang F, Morihara T, Teter B, Ubeda O, Rostaing P, Triller A, Salem N Jr, Ashe KH, Frautschy SA, Cole GM. Docosahexaenoic acid protects from dendritic pathology in an Alzheimer's disease mouse model. *Neuron* 2004; 43: 633-45.
- Campagna JA, Fallon J. Lipid rafts are involved in C95 (4,8) agrin fragment-induced acetylcholine receptor clustering. *Neuroscience* 2006; 138: 123-32.
- Cao D, Fukuchi KI, Wan H, Kim H, Li L. Lack of LDL receptor aggravates learning deficits and amyloid deposits in Alzheimer transgenic mice. *Neurobiol. Aging* 2005; [Epub ahead of print]
- Caramelli P, Nitrini R, Maranhao R, Lourenco AC, Damasceno MC, Vinagre C, Caramelli B. Increased apolipoprotein B serum concentration in Alzheimer's disease. *Acta Neurol. Scand.* 1999; 100: 61-3.
- Carmelli D, Swan GE, Reed T, Miller B, Wolf PA, Jarvik GP, Schellenberg GD. Midlife cardiovascular risk factors, ApoE, and cognitive decline in elderly male twins. *Neurology* 1998; 50: 1580-5.
- Casanova MF, Carosella NW, Gold JM, Kleinman JE, Weinberger DR, Powers RE. A topographical study of senile plaques and neurofibrillary tangles in the hippocampi of patients with Alzheimer's disease and cognitively impaired patients with schizophrenia. *Psychiatry Res.* 1993; 49: 41-62.
- Caselli RJ, Reiman EM, Osborne D, Hentz JG, Baxter LC, Hernandez JL, Alexander GG. Longitudinal changes in cognition and behavior in asymptomatic carriers of the APOE e4 allele. *Neurology* 2004; 62: 1990-5.
- Casetta I, Govoni V, Granieri E. Oxidative stress, antioxidants and neurodegenerative diseases. *Curr. Pharm. Des.* 2005; 11: 2033-52.
- Catto AJ, McCormack LJ, Mansfield MW, Carter AM, Bamford JM, Robinson P, Grant PJ. Apolipoprotein E polymorphism in cerebrovascular disease. *Acta Neurol. Scand.* 2000; 101: 399-404.
- Cedazo-Minguez A, Huttinger M, Cowburn RF. β -VLDL protects against A β (1-42) and apoE toxicity in human SH-SY5Y neuroblastoma cells. *Neuroreport* 2001; 12: 201-6.
- Chakravarti A, Slaugenhaupt SA, Zubenko GS. Inheritance pattern of platelet membrane fluidity in Alzheimer disease. *Am. J. Hum. Genet.* 1989; 44: 799-805.
- Chalmers KA, Culpan D, Kehoe PG, Wilcock GK, Hughes A, Love S. APOE promoter, ACE1 and CYP46 polymorphisms and beta-amyloid in Alzheimer's disease. *Neuroreport* 2004; 15: 95-8.
- Chen L, Baum L, Ng HK, Chan LY, Pang CP. Apolipoprotein E genotype and its pathological correlation in Chinese Alzheimer's disease with late onset. *Hum. Pathol.* 1999; 30: 1172-7.
- Choi J, Rees HD, Weintraub ST, Levey AI, Chin LS, Li L. Oxidative modifications and aggregation of Cu,Zn-superoxide dismutase associated with Alzheimer and Parkinson diseases. *J. Biol. Chem.* 2005; 280: 11648-55.
- Choi S, Kim JH, Roh EJ, Ko MJ, Jung JE, Kim HJ. Nuclear factor-kappaB activated by capacitative Ca²⁺ entry enhances muscarinic receptor-mediated soluble amyloid precursor protein (sAPP α) release in SH-SY5Y cells. *J. Biol. Chem.* 2006; 281: 12722-8.
- Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 1987; 162: 156-9.
- Chotani MA, Flavahan S, Mitra S, Daunt D, Flavahan NA. Silent α 2c-adrenergic receptors enable cold-induced vasoconstriction in cutaneous arteries. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2000; 278: H1075-83.
- Chu MI, Fontaine P, Kutty KM, Murphy D, Redheendran R. Cholinesterase in serum and low density lipoprotein of hyperlipidemic patients. *Clin. Chim. Acta* 1978; 85: 55-9.
- Churcher I, Ashton K, Butcher JW, Clarke EE, Harrison T, Lewis HD, Owens AP, Teall MR, Williams S, Wrigley JD. A new series of potent benzodiazepine γ -secretase inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2003; 13: 179-83.
- Clarris HJ, Cappai R, Heffernan D, Beyreuther K, Masters CL, Small DH. Identification of heparin-binding domains in the amyloid precursor protein of Alzheimer's disease by deletion mutagenesis and peptide mapping. *J. Neurochem.* 1997; 68: 1164-72.
- Colado MI, O'Shea E, Granados R, Murray TK, Green AR. In vivo evidence for free radical involvement in the degeneration of rat brain 5-HT following administration of MDMA ('ecstasy') and p-chloroamphetamine but not the degeneration following fenfluramine. *Br. J. Pharmacol.* 1997; 121: 889-900.
- Coen RF, O'Boyle CA, Coakley D, Lawlor BA. Individual quality of life factors distinguishing low-burden and high-burden caregivers of dementia patients. *Dement. Geriatr. Cogn. Disord.* 2002; 13:164-70.

- Colangelo V, Schurr J, Ball MJ, Pelaez RP, Bazan NG, Lukiw WJ. Gene expression profiling of 12633 genes in Alzheimer hippocampal CA1: Transcription and neurotrophic factor down-regulation and up regulation of apoptotic and proinflammatory signaling. *J. Neurosci. Res.* 2002; 70: 462-73.
- Colciaghi F, Marcello E, Borroni B, Zimmermann M, Caltagirone C, Cattabeni F, Padovani A, Di Luca M. Platelet APP, ADAM 10 and BACE alterations in the early stages of Alzheimer disease. *Neurology* 2004; 62: 498-501.
- Collins AR, Dusinska M, Gedik CM, Stetina R. Oxidative damage to DNA: do we have a reliable biomarker? *Environ. Health Perspect.* 1996; 104 Suppl 3: 465-9.
- Collister KA, Albeni BC. Potential therapeutic targets in the NF-kappaB pathway for Alzheimer's disease. *Drug. News Perspect.* 2005; 18: 623-9.
- Combarros O, Infante J, Llorca J, Berciano J. Polymorphism at codon 66 of the brain-derived neurotrophic factor gene is not associated with sporadic Alzheimer's disease. *Dement. Geriatr. Cogn. Disord.* 2004; 18: 55-8.
- Corder EH, Saunders AM, Risch NJ, Strittmatter WJ, Schmechel DE, Gaskell PC Jr, Rimmler JB, Locke PA, Conneally PM, Schmechel KE. Protective effect of apolipoprotein E type 2 allele for late onset Alzheimer disease. *Nat. Genet.* 1994; 7: 180-4.
- Coyle JT, Puttfarcken P. Oxidative stress, glutamate, and neurodegenerative disorders. *Science* 1993; 262: 689-95.
- Cousin MA, Robinson PJ. Two mechanisms of synaptic vesicle recycling in rat brain nerve terminals. *J. Neurochem.* 2000; 75: 1645-53.
- Cremesti AE, Goni FM, Kolesnick R. Role of sphingomyelinase and ceramide in modulating rafts: do biophysical properties determine biologic outcome? *FEBS Lett.* 2002; 531: 47-53.
- Crook R, Hardy J, Duff K. Single-day apolipoprotein E genotyping. *J. Neurosci. Methods* 1994; 53: 125-7.
- Crystal H, Dickson D, Fuld P, Masur D, Scott R, Mehler M, Masdeu J, Kawas C, Aronson M, Wolfson L. Clinico-pathologic studies in dementia: nondemented subjects with pathologically confirmed Alzheimer's disease. *Neurology* 1988; 38: 1682-7.
- Csaszar A, Dieplinger H, Sandholzer C, Karadi I, Juhasz E, Drexel H, Halmos T, Romics L, Patsch JR, Utermann G. Plasma lipoprotein (a) concentration and phenotypes in diabetes mellitus. *Diabetologia* 1993; 36: 47-51.
- Csaszar A, Kalman J, Szalai Cs, Janka Z, Romics L. Association of the apolipoprotein A-IV codon 360 mutation in patients with Alzheimer's disease. *Neurosci. Lett.* 1997; 230: 151-4.
- Cucuianu M, Popescu TA, Opincaru A, Haragus S. Serum pseudocholinesterase and ceruloplasmin in various types of hyperlipoproteinemia. *Clin. Chim. Acta* 1975; 59: 19-27.
- Cucuianu M, Zdrengea D, Pop M, Opincaru A. Increased serum gamma-glutamyltransferase in hypertriglyceridemia: comparison with serum pseudocholinesterase. *Clin. Chim. Acta* 1976; 71: 419-27.
- Cunliffe VT. Memory by modification: the influence of chromatin structure on gene expression during vertebrate development. *Gene* 2003; 305: 141-150.
- Dandoy-Dron F, Guillo F, Benboudjema L, Deslys JP, Lasmezas C, Dormont D, Tovey MG, Dron M. Gene expression in scrapie. Cloning of a new scrapie-responsive gene and the identification of increased levels of seven other mRNA transcripts. *J. Biol. Chem.* 1998; 273: 7691-7.
- Danguy A, Camby I, Kiss R. Galectins and cancer. *Biochim. Biophys. Acta* 2002; 1572: 285-93.
- Darvesh S, Martin E, Walsh R, Rockwood K. Differential effects of lipid-lowering agents on human cholinesterases. *Clin. Biochem.* 2004; 37: 42-9.
- Davies KE. DNA studies of X-linked mental retardation associated with a fragile site at Xq27. *Am. J. Med. Genet.* 1986; 23: 633-42.
- Davignon J, Gregg RE, Sing CF. Apolipoprotein E polymorphism and atherosclerosis. *Arteriosclerosis* 1988; 8: 1-21.
- De la Cruz CP, Revilla E, Steffen V, Rodriguez-Gomez JA, Cano J, Machado A. Protection of the aged substantia nigra of the rat against oxidative damage by (-)-deprenyl. *Br. J. Pharmacol.* 1996; 117: 1756-60.
- Desai P, DeKosky ST, Kamboh MI. Genetic variation in the cholesterol 24-hydroxylase (CYP46) gene and the risk of Alzheimer's disease. *Neurosci. Lett.* 2002; 2: 9-12.
- Dichtl W, Dulak J, Frick M, Alber HF, Schwarzbacher SP, Ares MP, Nilsson J, Pachinger O, Weidinger F. HMG-CoA reductase inhibitors regulate inflammatory transcription factors in human endothelial and vascular smooth muscle cells. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2003; 23: 58-63.
- Dietschy JM, and Turley SD. Cholesterol metabolism in the brain. *Curr. Opin. Lipidol.* 2001; 12: 105-12.
- Di Luca M, Pastorino L, Bianchetti A, Perez J, Vignolo LA, Lenzi GL, Trabucchi M, Cattabeni F, Padovani A. Differential level of platelet amyloid beta precursor protein isoforms: an early marker for Alzheimer disease. *Arch. Neurol.* 1998; 55: 1195-200.
- Dobretsov GE, Borschevskaya TA, Petrov VA, Vladimirov YA. The increase of phospholipid bilayer rigidity after lipid peroxidation. *FEBS Lett.* 1977; 84: 125-8.
- Drayna D, Fielding C, McLean J, Baer B, Castro G, Chen E, Comstock L, Henzel W, Kohr W, Rhee L, Wion K, Lawn R. Cloning and expression of human apolipoprotein D cDNA. *J. Biol. Chem.* 1986; 261: 16535-9.
- Drevets WC, Price JL, Simpson Jr, Todd RD, Reich T, Vannier M, Raichle ME. Subgenual prefrontal cortex abnormalities in mood disorders. *Nature* 1997; 386: 824-7.
- Duman RS. Depression: a case of neuronal life and death? *Biol*

- Psychiatry* 2004; 56: 140-5.
- Eckert GP, Wood WG, Muller WE. Membrane disordering effects of beta-amyloid peptides. *Subcell. Biochem.* 2005; 38:319-37.
- Eckert A, Cotman CW, Zerfass R, Hennerici M, Muller WE. Lymphocytes as cell model to study apoptosis in Alzheimer's disease: Vulnerability to programmed cell death appears to be altered. *J. Neurol. Transm.* 1998; 54: 259-267.
- Eddin M. The state of lipid rafts: from model membranes to cells. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 2003; 32: 257-83.
- Eisen MB, Spellman PT, Brown PO, Botstein D. Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1998; 95: 14863-88.
- Eison AS, Yocca FD, Gianutsos G. Effect of chronic administration of antidepressant drugs on 5-HT₂-mediated behavior in the rat following noradrenergic or serotonergic denervation. *J. Neural Transm. Gen. Sect.* 1991; 84: 19-32.
- Ellman GL, Courtney KD, Andres V. Jr, Feather-Stone RM. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.* 1961; 7: 88-95.
- Esch FS, Keim PS, Beattie EC, Blacher RW, Culwell AR, Oltersdorf T, McClure D, Ward PJ. Cleavage of amyloid β peptide during constitutive processing of its precursor. *Science* 1990; 248: 1122-4.
- Escriba PV. Membrane-lipid therapy: a new approach in molecular medicine. *Trends Mol. Med.* 2006; 12: 34-43.
- Etcheberrigaray R, Bhagavan S. Ionic and signal transduction alterations in Alzheimer's disease: Relevance of studies on peripheral cells. *Mol. Neurobiol.* 1999; 20: 93-109.
- Evans RM, Emsley CL, Gao S, Sahota A, Hall KS, Farlow MR, Hendrie H. Serum cholesterol, APOE genotype, and the risk of Alzheimer's disease: a population-based study of African Americans. *Neurology* 2000; 54: 240-2.
- Farlow MR, Cyrus PA, Nadel A, Lahiri DK, Brashear A, Gulanski B. Metrifonate treatment of AD: influence of APOE genotype. *Neurology* 1999; 53: 2010-6.
- Farr SA, Uezu K, Flood JF, Morley JE. Septo-hippocampal drug interactions in post-trial memory processing. *Brain Res.* 1999; 847: 221-30.
- Fassbender K, Simons M, Bergmann C, Stroick M, Lutjohann D, Keller P, Runz H, Kuhl S, Bertsch T, von Bergmann K, Hennerici M, Beyreuther K, Hartmann T. Simvastatin strongly reduces levels of Alzheimer's disease beta-amyloid peptides Abeta 42 and Abeta 40 in vitro and in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2001; 98: 5856-61.
- Fastbom J, Forsell Y, Winblad B. Benzodiazepines may have protective effects against Alzheimer disease. *Alzheimer. Dis. Assoc. Disord.* 1998; 12:14-7.
- Felsner P, Hofer D, Rinner I, Porta S, Korsatko W, Schauenstein K. Adrenergic suppression of peripheral blood T cell reactivity in the rat is due to activation of peripheral α 2-receptors. *J. Neuroimmunol.* 1995; 57: 27-34.
- Felten DL, Felten SY, Bellinger DL, Ackerman KD, Madden KS. Noradrenergic sympathetic neural interactions with immune system: structure and function. *Immunol. Rev.* 1987; 100: 225-60.
- Ferri CP, Prince M, Brayne C, Brodaty H, Fratiglioni L, Ganguli M, Hall K, Hasegawa K, Hendrie H, Huang Y, Jorm A, Mathers C, Menezes PR, Rimmer E, Sczufca M. Alzheimer's Disease International. Global prevalence of dementia: a Delphi consensus study. *Lancet* 2005; 366: 2112-7.
- Ferriere F, Khan NA, Troutaud D, Deschaux P. Serotonin modulation of lymphocyte proliferation via 5-HT_{1A} receptors in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Dev. Comp. Immunol.* 1996; 20: 273-83.
- Ferris SH, Steinberg G, Shulman E, Kahn R, Reisberg B. Institutionalization of Alzheimer's disease patients: reducing precipitating factors through family counseling. *Home Health Care Serv. Q.* 1987; 8: 23-51.
- Filip V, Kolibas E. Selegiline in the treatment of Alzheimer's disease: a long-term randomized placebo-controlled trial. Czech and Slovak Senile Dementia of Alzheimer Type Study Group. *J. Psychiatry Neurosci.* 1999; 24: 234-43.
- Firuzi O, Pratico D. Coxibs and Alzheimer's disease: should they stay or should they go? *Ann. Neurol.* 2006; 59: 219-28.
- Fishman EB, Siek GC, MacCallum RD, Bird ED, Volicer L, Marquis JK. Distribution of the molecular forms of acetylcholinesterase in human brain: alterations in dementia of the Alzheimer type. *Ann. Neurol.* 1986; 19: 246-52.
- Florent S, Malaplate-Armand C, Youssef I, Kriem B, Koziel V, Escanye MC, Fife A, Sponne I, Leininger-Muller B, Olivier JL, Pillot T, Oster T. Docosahexaenoic acid prevents neuronal apoptosis induced by soluble amyloid-beta oligomers. *J. Neurochem.* 2006; 96:385-95.
- Folch J, Lees M, Sloane-Stanley GH. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.* 1957; 226: 497-509.
- Fox HC, McLean A, Turner JJ, Parrott AC, Rogers R, Sahakian BJ. Neuropsychological evidence of a relatively selective profile of temporal dysfunction in drug-free MDMA ("ecstasy") polydrug users. *Psychopharmacology* 2002; 162: 203-14.
- Frears ER, Stephens DJ, Walters CE, Davies H, Austen BM. The role of cholesterol in the biosynthesis of beta-amyloid. *Neuroreport* 1999; 10: 1699-1705.
- Frisoni GB, Calabresi L, Geroldi C, Bianchetti A, D'Acquarica AL, Govoni S, Sirtori CR, Trabucchi M, Franceschini G. Apolipoprotein E epsilon 4 allele in Alzheimer's disease and vascular dementia. *Dementia* 1994; 5: 240-2.
- Gabbita SP, Lovell MA, Markesbery WR. Increased nuclear DNA oxidation in the brain in Alzheimer's disease. *J.*

- Neurochem.* 1998; 71: 2034-40.
- Gabuzda D, Busciglio J, Yankner BA. Inhibition of beta-amyloid production by activation of protein kinase C. *J. Neurochem.* 1993; 61: 2326-9.
- Galbete JL, Martin TR, Peressini E, Modena P, Bianchi R, Forloni G. Cholesterol decreases secretion of the secreted form of amyloid precursor protein by interfering with glycosylation in the protein secretory pathway. *Biochem. J.* 2000; 348 Pt2: 307-13.
- Galter D, Mihm S, Droge W. Distinct effects of glutathione disulphide on the nuclear transcription factor kappa B and the activator protein-1. *Eur. J. Biochem.* 1994; 221: 639-48.
- Gasparini M, Vanacore N, Schiaffini C, Brusa L, Panella M, Talarico G, Bruno G, Meco G, Lenzi GL. A case-control study on Alzheimer's disease and exposure to anesthesia. *Neurol. Sci.* 2002; 23: 11-4.
- Gatz M, Pedersen NL, Berg S, Johansson B, Johansson K, Mortimer JA, Posner SF, Viitanen M, Winblad B, Ahlbom A. Heritability for Alzheimer's disease: the study of dementia in Swedish twins. *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.* 1997; 52: 117-25.
- Gecse A, Ottlecz A, Mezei Z, Telegdy G, Joó F, Dux E, Karnushina I. (1982) Prostacyclin and prostaglandin synthesis in isolated brain capillaries. *Prostaglandins* 1982; 23: 287-97.
- Geula C, Mesulam M. Special properties of cholinesterases in the cerebral cortex of Alzheimer's disease. *Brain Res.* 1989; 498: 185-9.
- Giambalvo CT. Protein kinase C and dopamine release – II : Effect of dopamine acting drugs *in vivo*. *Biochem. Pharmacol.* 1988; 37: 4009-17.
- Gibson RA, McMurchie EJ, Charnock JS, Kneebone GM. Homeostatic control of membrane fatty acid composition in the rat after dietary lipid treatment. *Lipids* 1984; 19: 942-51.
- Glomset JA. Role of docosahexaenoic acid in neuronal plasma membranes. *Sci STKE.* 2006; 321: 6.
- Gomez-Ramos P, Mufson EJ, Moran MA. Apolipoprotein E immunoreactivity in neurons and neurofibrillary degeneration of aged non-demented and Alzheimer's disease patients. *Microsc. Res. Tech.* 2001; 55: 48–58.
- Gough B, Ali SF, Slikker W Jr, Holson RR. Acute effects of 3,4-methylenedioxy-methamphetamine (MDMA) on monoamines in rat caudate. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 1991; 39: 619-23.
- Gramsbergen JB, Hodgkins PS, Rassoulpour A, Turski WA, Guidetti P, Schwarcz R. Brain-specific modulation of kynurenic acid synthesis in the rat. *J. Neurochem.* 1997; 69: 290-8.
- Grossmann A, Kukull WA, Jinneman JC, Bird TD, Villacres EC, Larson EB, Rabinovitch PS. Intracellular calcium response is reduced in CD4+ lymphocytes in Alzheimer's disease and in older persons with Down's syndrome. *Neurobiol. Aging* 1993; 14: 177-85.
- Guidetti P, Okuno E, Schwarcz R. Characterization of rat brain kynurenic acid aminotransferases I and II. *J. Neurosci. Res.* 1997; 50: 457-65.
- Guillemin GJ, Brew BJ. Implications of the kynurenic acid pathway and quinolinic acid in Alzheimer's disease. *Redox Rep.* 2002; 7: 199-206.
- Gyarmati S, Timár J, Bizderi B, Poór P, Szabó A, Fürst S. Behavioural differences in methylenedioxy-methamphetamine (MDMA) enantiomers induced neurotoxicity. *Eur. Neuropsychopharmacol.* 2002; 12: S391.
- Haan MN, Shemanski L, Jagust WJ, Manolio TA, Kuller L. The role of APOE epsilon4 in modulating effects of other risk factors for cognitive decline in elderly persons. *JAMA* 1999; 282: 40-6.
- Haass C, Schlossmacher MG, Hung AY, Vigo-Pelfrey C, Mellon A, Ostaszewski BL, Lieberburg I, Koo EH, Schenk D, Teplow DB, et al. Amyloid beta-peptide is produced by cultured cells during normal metabolism. *Nature* 1992; 359: 322-5.
- Haass C, Selkoe DJ. Cellular processing of beta-amyloid precursor protein and the genesis of amyloid beta-peptide. *Cell* 1993; 75: 1039-42.
- Hachinski VC. The decline and resurgence of vascular dementia. *CMAJ* 1990; 142: 107-11.
- Hachinski VC, Iliff LD, Zilhka E, Du Boulay GH, McAllister VL, Marshall J, Russell RW, Symon L. Cerebral blood flow in dementia. *Arch. Neurol.* 1975; 32: 632-7.
- Hailstones D, Sleer LS, Parton RG, Stanley KK. Regulation of caveolin and caveolae by cholesterol in MDCK cells. *J. Lipid Res.* 1998; 39: 369-79.
- Hajjar J, Schumpert J, Hirth V, Wieland D, Eleazer GP. The impact of the use of statins on the prevalence of dementia and the progression of cognitive impairment. *J. Gerontol. A Biol. Sci. Med. Sci.* 2002; 57: 414-8.
- Hallman DM, Boerwinkle E, Saha N, Sandholzer C, Menzel HJ, Csaszar A, Utermann G. The apolipoprotein E polymorphism: a comparison of allele frequencies and effects in nine populations. *Am. J. Hum. Genet.* 1991; 49: 338-49.
- Hamidi M, Drevets WC, Price JL. Glial reduction in amygdala in major depressive disorder is due to oligodendrocytes. *Biol. Psychiatry* 2004; 55: 563-9.
- Han SH, Hulette C, Saunders AM, Einstein G, Pericak-Vance M, Strittmatter WJ, Roses AD, Schmechel DE. Apolipoprotein E is present in hippocampal neurons without neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease and in age-matched controls. *Exp. Neurol.* 1994; 128: 13-26.
- Han X, Cheng H, Fryer JD, Fagan AM, Holtzman DM. Novel role for apolipoprotein E in the central nervous system. Modulation of sulfatide content. *J. Biol. Chem.* 2003; 278: 8043–51.
- Handelmann GE, Boyles JK, Weisgraber KH, Mahley RW, Pitas RE. Effects of apolipoprotein E, beta-very low density lipoproteins, and cholesterol on the extension of neurites by

- rabbit dorsal root ganglion neurons in vitro. *J. Lipid Res.* 1992; 33: 1677-88.
- Harding RM, Sokal RR. Classification of the European language families by genetic distance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1988; 85: 9370-2.
- Hardy J, Gwinn-Hardy K. Genetic classification of primary neurodegenerative disease. *Science* 1998; 282: 1075-9.
- Hardy J, Selkoe DJ. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress and problems on the road to therapeutics. *Science* 2002; 297: 353-6.
- Hardy JA, Higgins GA. Alzheimer's disease: the amyloid cascade hypothesis. *Science* 1992; 256: 184-5.
- Harlan RE, Kailas SR, Tagoe CE, Garcia MM. Morphine actions in the rat forebrain: role of protein kinase C. *Brain Res. Bull.* 2004; 62: 285-95.
- Harr SD, Uint L, Hollister R, Hyman BT, Mendez AJ. Brain expression of apolipoproteins E, J, and A-I in Alzheimer's disease. *J. Neurochem.* 1996; 66: 2429-35.
- Hartai Zs, Klivényi P, Janáky T, Penke B, Dux L, Vécsei L. Kynurenine metabolism in plasma and in red blood cells in Parkinson's disease. *J. Neurol. Sci.* 2005 239: 31-5.
- Hashimoto M, Hossain S, Shimada T, Sugioka K, Yamasaki H, Fujii Y, Ishibashi Y, Oka J, Shido O. Docosahexaenoic acid provides protection from impairment of learning ability in Alzheimer's disease model rats. *J. Neurochem.* 2002; 81: 1084-91.
- Hashimoto M, Hossain S, Agdul H, Shido O. Docosahexaenoic acid-induced amelioration on impairment of memory learning in amyloid beta-infused rats relates to the decreases of amyloid beta and cholesterol levels in detergent-insoluble membrane fractions. *Biochim. Biophys. Acta* 2005; 1738: 91-8.
- Helisalmi S, Hiltunen M, Valonen P, Mannermaa A, Koivisto AM, Lehtovirta M, Ryyanen M, Soininen H. Promoter polymorphism (-491A/T) in the APOE gene of Finnish Alzheimer's disease patients and control individuals. *J. Neurol.* 1999; 246: 821-4.
- Herrmann N, Lanctot KL. Do atypical antipsychotics cause stroke? *CNS Drugs* 2005; 19:91-103.
- Heyes MP, Saito K, Crowley JS, Davis LE, Demitrack MA, Der M, Dilling LA, Elia J, Kruesi MJ, Lackner A. Quinolinic acid and kynurenine pathway metabolism in inflammatory and non-inflammatory neurological disease. *Brain* 1992; 115: 1249-73.
- Hicks N, Brammer MJ, Hymas N, Levy R. Platelet membrane properties in Alzheimer and multi-infarct dementias. *Alzheimer Dis. Assoc. Disord.* 1987; 1: 90-7.
- Higaki J, Murphy GM Jr, Cordell B. Inhibition of β -amyloid formation by haloperidol: a possible mechanism for reduced frequency of Alzheimer's disease pathology in schizophrenia. *J. Neurochem.* 1997; 68: 333-6.
- Higami Y, Shimokawa I. Apoptosis in the aging process. *Cell Tissue Res.* 2000; 301: 125-32.
- Hiltunen M, Mannermaa A, Helisalmi S, Koivisto A, Lehtovirta M, Ryyanen M, Riekkinen P Sr, and Soininen H. Butyrylcholinesterase K variant and apolipoprotein E4 genes do not act in synergy in Finnish late-onset Alzheimer's disease patients. *Neurosci. Lett.* 1998; 250: 69-71.
- Hofman A, Ott A, Breteler MM, Bots ML, Slioter AJ, van Harskamp F, van Duijn CN, Van Broeckhoven C, Grobbee DE. Atherosclerosis, apolipoprotein E, and prevalence of dementia and Alzheimer's disease in the Rotterdam Study. *Lancet* 1997; 349: 151-4.
- Holsinger RM, McLean CA, Beyreuther K, Masters CL, Evin G. Increased expression of the amyloid precursor beta-secretase in Alzheimer's disease. *Ann. Neurol.* 2002; 51: 783-6.
- Howlett DR, Simmons DL, Dingwall C, Christie G. In search of an enzyme: the beta-secretase of Alzheimer's disease is an aspartic proteinase. *Trends Neurosci.* 2000; 23: 565-70.
- Huang TL, Zandi PP, Tucker KL, Fitzpatrick AL, Kuller LH, Fried LP, Burke GL, Carlson MC. Benefits of fatty fish on dementia risk are stronger for those without APOE epsilon4. *Neurology* 2005; 65:1409-14.
- Hu CJ, Sung SM, Liu HC, Hsu WC, Lee LS, Lee CC, Tsai CH, Chang JG. Genetic risk factors of sporadic Alzheimer's disease among Chinese in Taiwan. *J. Neurol. Sci.* 2000; 181: 127-31.
- Hyman SE. Even chromatin gets the blues. *Nat. Neurosci.* 2006; 9(4): 465-6.
- Hwang SM, Weiss S, Segal S. Uptake of L-[35S]cystine by isolated rat brain capillaries. *J. Neurochem.* 1980; 35: 417-24.
- Inestrosa NC, Alarcon R, Arriagada J, Donoso A, Alvarez J, Campos EO. Blood markers in Alzheimer disease: subnormal acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase in lymphocytes and erythrocytes. *J. Neurol. Sci.* 1994; 122: 1-5.
- Ingelsson M, Jesneck J, Irizarry MC, Hyman BT, Rebeck GW. Lack of association of the cholesterol 24-hydroxylase (CYP46) intron 2 polymorphism with Alzheimer's disease. *Neurosci. Lett.* 2004; 367: 228-31.
- Jain R, Kutty KM, Huang SN, Kean K. Pseudocholinesterase/high-density lipoprotein cholesterol ratio in serum of normal persons and of hyperlipoproteinemics. *Clin. Chem.* 1983; 29: 1031-3.
- Janka Z, Juhasz A, Rimanoczy A, Boda K, Marki-Zay J, Kalman J. Codon 311 (Cys --> Ser) polymorphism of paraoxonase-2 gene is associated with apolipoprotein E4 allele in both Alzheimer's and vascular dementias. *Mol. Psychiatry.* 2002; 7: 110-2.
- Jans DM, Martinet W, Van De Parre TJ, Herman AG, Bult H, Kockx MM, De Meyer GR. Processing of amyloid precursor protein as a biochemical link between atherosclerosis and

- Alzheimer's disease. *Cardiovasc. Hematol. Disord. Drug Targets* 2006; 6: 21-34.
- Jarskog LF. Apoptosis in schizophrenia: pathophysiologic and therapeutic considerations. *Curr. Opin. Psychiatry* 2006; 19: 307-12.
- Jarvik GP, Wijsman EM, Kukull WA, Schellenberg GD, Yu C, Larson EB. Interactions of apolipoprotein E genotype, total cholesterol level, age, and sex in prediction of Alzheimer's disease: a case-control study. *Neurology* 1995; 45: 1092-6.
- Jaruga P, Dizdaroglu M. Repair of products of oxidative DNA base damage in human cells. *Nucl. Acids Res.* 1996; 24: 1389-94.
- Jawien J, Nastalek P, Korbut R. Mouse models of experimental atherosclerosis. *J. Physiol. Pharmacol.* 2004; 55: 503-17.
- Jetschmann JU, Benschop RJ, Jacobs R, Kemper A, Oberbeck R, Schmidt RE, Schedlowski M. Expression and *in vivo* modulation of α - and β -adrenoceptors on human natural killer (CD16+) cells. *J. Neuroimmunol.* 1997; 74: 159-64.
- Jick H, Zornberg GL, Jick SS, Seshadri S, and Drachman DA. Statins and the risk of dementia. *Lancet* 2000; 356: 1627-31.
- Jin LW, Shie FS, Maezawa I, Vincent I, Bird T. Intracellular accumulation of amyloidogenic fragments of amyloid-beta precursor protein in neurons with Niemann-Pick type C defects is associated with endosomal abnormalities. *Am. J. Pathol.* 2004; 164: 975-85.
- John V. Human beta-secretase (BACE) and BACE inhibitors: progress report. *Curr. Top. Med. Chem.* 2006; 6: 569-78.
- Johansson A, Katzov H, Zetterberg H, Feuk L, Johansson B, Bogdanovic N, Andreasen N, Lenhard B, Brookes AJ, Pedersen NL, Blennow K, Prince JA. Variants of CYP46A1 may interact with age and APOE to influence CSF Abeta42 levels in Alzheimer's disease. *Hum. Genet.* 2004; 114: 581-7.
- Johnston JA, Norgren S, Ravid R, Wasco W, Winblad B, Lannfelt L, Ceburn RF. Quantification of APP and APLP2 mRNA in APOE genotyped Alzheimer's disease brains. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 1996; 43: 85-95.
- Joó F. The blood-brain barrier. New aspects to the function of the cerebral endothelium. *Nature* 1986; 321: 197-8.
- Juhász A, Rimanóczy Á, Kálmán J, Csibri É, Dibó Gy, Majtényi K, Janka Z. Genetikai polimorfizmusok különféle eredetű demencia állapotokban. *Neuropsychopharmacol. Hung.* 2003; 1: 4-12.
- Kabara JJ. A critical review of brain cholesterol metabolism. *Prog. Brain Res.* 1973; 40: 363-82.
- Kabbara A, Payet N, Cattel D, Frigard B, Amouyel P, Lambert JC. Exclusion of CYP46 and APOM as candidate genes for Alzheimer's disease in a French population. *Neurosci. Lett.* 2004; 363: 139-43.
- Kadioglu E, Sardas S, Aslan S, Isik E, Esat KA. Detection of oxidative DNA damage in lymphocytes of patients with Alzheimer's disease. *Biomarkers* 2004; 9: 203-9.
- Kakio A, Nishimoto SI, Yanagisawa K, Kozutsumi Y, Matsuzaki K. Cholesterol-dependent formation of GM1 ganglioside-bound amyloid beta-protein, an endogenous seed for Alzheimer amyloid. *J. Biol. Chem.* 2001; 276: 24985-90.
- Kalaria RN. The role of cerebral ischemia in Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* 2000; 21: 321-30.
- Kalaria RN. Vascular factors in Alzheimer's disease. *Int. Psychogeriatr.* 2003; 15 Suppl 1: 47-52.
- Kalback W, Esh C, Castano EM, Rahman A, Kokjohn T, Luehrs DC, Sue L, Cisneros R, Gerber F, Richardson C, Bohrmann B, Walker DG, Beach TG, Roher AE. Atherosclerosis, vascular amyloidosis and brain hypoperfusion in the pathogenesis of sporadic Alzheimer's disease. *Neurol. Res.* 2004; 26: 525-39.
- Kálmán J, Juhász A, Laird G, Dickens P, Járdánházy T, Rimanóczy A, Boncz I, Parry-Jones WL, Janka Z. Serum interleukin-6 levels correlate with the severity of dementia in Down syndrome and in Alzheimer's disease. *Acta Neurol. Scand.* 1997; 96: 236-40.
- Kálmán J, Márki-Zay J, Juhász A, Sántha A, Dux L, Janka Z. Serum and cerebrospinal fluid cystatin C levels in vascular and Alzheimer's dementia. *Acta Neurol. Scand.* 2000a; 101:279-82.
- Kálmán J, Juhász A, Rimanóczy Á, Majtényi K, Jakab K, Gárdián G, Raskó I, Janka Z. Apolipoprotein E polymorphism in Pick's disease and in Huntington's disease. *Neurobiol. Aging* 2000b; 21: 555-8.
- Kalmijn S, Feskens EJ, Launer LJ, Kromhout D. Cerebrovascular disease, the apolipoprotein e4 allele, and cognitive decline in a community-based study of elderly men. *Stroke* 1996; 27: 2230-5.
- Kalow W. Atypical plasma cholinesterase. A personal discovery story: a tale of three cities. *Can. J. Anaesth.* 2004; 51: 206-11.
- Kamboh MI. Apolipoprotein E polymorphism and susceptibility to Alzheimer's disease. *Hum. Biol.* 1995; 67: 195-215.
- Kamboh MI, Kelly LJ, Ferrell RE. Genetic studies of human apolipoproteins: XIV. A simple agarose isoelectric focusing gel method for apolipoprotein E phenotyping. *Electrophoresis* 1990; 11: 314-8.
- Kamboh MI, Weiss KM, Ferrell RE. Genetic studies of human apolipoproteins. XVI. APOE polymorphism and cholesterol levels in the Mayans of the Yucatan Peninsula, Mexico. *Clin. Genet.* 1991; 39: 26-32.
- Kaneko I, Yamada N, Sakuraba Y, Kamenosono M, Tutumi S. Suppression of mitochondrial succinate dehydrogenase, a primary target of beta-amyloid, and its derivative racemized at Ser residue. *J. Neurochem.* 1995; 65: 2585-93.
- Kang J, Lemaire HG, Unterbeck A, Salbaum JM, Masters CL, Grzeschik KH, Multhaup G, Beyreuther K, Muller-Hill B.

- The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor *Nature* 1987; 325: 733-6.
- Karran L, Dyer MJ. Proteolytic cleavage of molecules involved in cell death or survival pathways: a role in the control of apoptosis? *Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr.* 2001; 11: 269-77.
- Kataoka Y, Koizumi S, Kohzuma M, Shibaguchi H, Shigematsu K, Niwa M, Taniyama K. NMDA receptor involvement in endothelin neurotoxicity in rat striatal slices. *Eur. J. Pharmacol.* 1995; 273: 285-9.
- Kawamata J, Tanaka S, Shimohama S, Ueda K, Kimura J. Apolipoprotein E polymorphism in Japanese patients with Alzheimer's disease or vascular dementia. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 1994; 57: 1414-6.
- Kim E, and Young SG. Genetically modified mice for the study of apolipoprotein B. *J. Lipid Res.* 1998; 39: 703-23.
- Kinon BJ, Lieberman JA. Mechanisms of action of atypical antipsychotic drugs: a critical analysis. *Psychopharmacology* 1996; 124: 2-34.
- Kirazov E, Kirazov L, Bigl V, Schliebs R. Ontogenetic changes in protein level of amyloid precursor protein (APP) in growth cones and synaptosomes from rat brain and prenatal expression pattern of APP mRNA isoforms in developing rat embryo. *Int. J. Dev. Neurosci.* 2001; 19: 287-96.
- Kitajka K, Puskas LG, Zvara A, Hackler L Jr, Barcelo-Coblijn G, Yeo YK, Farkas T. The role of n-3 polyunsaturated fatty acids in brain: modulation of rat brain gene expression by dietary n-3 fatty acids. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2002; 99: 2619-24.
- Kivipelto M, Helkala EL, Laakso MP, Hanninen T, Hallikainen M, Alhainen K, Soininen H, Tuomilehto J, Nissinen A. Midlife vascular risk factors and Alzheimer's disease in later life: longitudinal, population based study. *BMJ* 2001; 322: 1447-51.
- Kolsch H, Lutjohann D, Ludwig M, Schulte A, Ptak U, Jessen F, von Bergmann K, Rao ML, Maier W, Heun R. Polymorphism in the cholesterol 24S-hydroxylase gene is associated with Alzheimer's disease. *Mol. Psychiatry* 2002; 7: 899-902.
- Kopp M. A magyar népesség idő előtti egészségromlásának és halálózásának bio-pszichoszociális meghatározói és a megelőzés lehetőségei. 2002; *NKFP témajelentés, O.M.*
- Korenberg JR, Kawashima H, Pulst SM, Ikeuchi T, Ogasawara N, Yamamoto K, Schonberg SA, West R, Allen L, Magenis E. Molecular definition of a region of chromosome 21 that causes features of the Down syndrome phenotype. *Am. J. Hum. Genet.* 1990; 47: 236-46.
- Koudinov AR, Koudinova NV. Cholesterol homeostasis failure as a unifying cause of synaptic degeneration. *J. Neurol. Sci.* 2005; 229-230: 233-40.
- Kovács M (szerk.) *Időskori depresszió és szorongás*. Springer Tudományos Kiadó, Budapest, 2003.
- Kriem B, Sponne I, Fife A, Malaplate-Armand C, Lozac'h-Pillot K, Koziel V, Yen-Potin FT, Bihain B, Oster T, Olivier JL, Pillot T. Cytosolic phospholipase A2 mediates neuronal apoptosis induced by soluble oligomers of the amyloid-beta peptide. *FASEB J.* 2005; 19: 85-7.
- Kuhry JG, Bronner C, Amellal M, Landry Y. Plasma membrane fluidity studies by fluorescence polarization in rat mast cells stimulated by compound 48/80. *Agents Actions* 1985; 16: 109-12.
- Kukull WA, Hinds TR, Schellenberg GD, van Belle G, Larson EB. Increased platelet membrane fluidity as a diagnostic marker for Alzheimer's disease: a test in population-based cases and controls. *Neurology* 1992; 42: 607-14.
- Kulms D, Schwarz T. Independent contribution of three different pathways to ultraviolet-B-induced apoptosis. *Biochem. Pharmacol.* 2002; 64: 837-41.
- Kutty KM, Jain R, Huang S, Kean K. Serum pseudocholinesterase: high density lipoprotein cholesterol ratio as an index of risk for cardiovascular disease. *Clin. Chim. Acta* 1981; 115: 55-61.
- Kutty KM, Payne RH. Serum pseudocholinesterase and very-low-density lipoprotein metabolism. *J. Clin. Lab. Anal.* 1994; 8: 247-50.
- La Du BN, Bartels CF, Nogueira CP, Hajra A, Lightstone H, Van der Spek A, Lockridge O. Phenotypic and molecular biological analysis of human butyrylcholinesterase variants. *Clin. Biochem.* 1990; 23: 423-31.
- Ladu MJ, Reardon C, Van Eldik L, Fagan AM, Bu G, Holtzman D, Getz GS. Lipoproteins in the central nervous system. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2000; 903: 167-75.
- Lahiri DK, Sambamurti K, Bennett DA. Apolipoprotein gene and its interaction with the environmentally driven risk factors: molecular, genetic and epidemiological studies of Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* 2004; 25: 651-60.
- Lahiri DK, Ge YW. Role of the APP promoter in Alzheimer's disease: cell type-specific expression of the beta-amyloid precursor protein. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2004; 1030: 310-6.
- Laurin D, Verreault R, Lindsay J, Dewailly E, Holub BJ. Omega-3 fatty acids and risk of cognitive impairment and dementia. *J. Alzheimers Dis.* 2003; 5: 315-22.
- Lea OA. Binding properties of progesterone-binding cyst protein, PBCP. *Steroids* 1988; 52: 337-8.
- LeBlanc AC. The role of apoptotic pathways in Alzheimer's disease neurodegeneration and cell death. *Curr. Alzheimer Res.* 2005; 2: 389-402.
- Lee SJ, Liyanage U, Bickel PE, Xia W, Lansbury PT Jr, Kosik KS. A detergent-insoluble membrane compartment contains A beta in vivo. *Nat. Med.* 1998; 4: 730-4.
- Lee DW, Liu HC, Liu TY, Chi CW, Hong CJ. No association between butyrylcholinesterase K-variant and Alzheimer disease in Chinese. *Am. J. Med. Genet.* 2000; 96: 167-9.

- Lee SY, Choe YS, Kim YR, Paik JY, Choi BW, Kim SE, Lee KH, Choi Y, Kim BT. Synthesis and evaluation of 5,7-dihydro-3-[2-[1-(4-[18F]-fluorobenzyl)-4-piperidinyl]ethyl]-6H-pyrrolo[3,2-f]-1,2-benzisoxazol-6-one for in vivo mapping of acetylcholinesterase. *Nucl. Med. Commun.* 2004; 25: 591-6.
- Lehmann DJ, Johnston C, Smith AD. Synergy between the genes for butyrylcholinesterase K variant and apolipoprotein E4 in late-onset confirmed Alzheimer's disease. *Hum. Mol. Genet.* 1997; 6: 1933-6.
- Leveugle B, Ding W, Durkin JT, Mistretta S, Eisle J, Matic M, Siman R, Greenberg BD, Fillit HM. Heparin promotes beta-secretase cleavage of the Alzheimer's amyloid precursor protein. *Neurochem. Int.* 1997; 30: 543-8.
- Li X, Song L, Jope RS. Glutathione depletion exacerbates impairment by oxidative stress of phosphoinositide hydrolysis, AP-1, and NF-kappaB activation by cholinergic stimulation. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 1998; 53: 196-205.
- Lin-Lee YC, Kao FT, Cheung P, Chan L. Apolipoprotein E gene mapping and expression: localization of the structural gene to human chromosome 19 and expression of ApoE mRNA in lipoprotein- and non-lipoprotein-producing tissues. *Biochemistry* 1985; 24: 3751-6.
- Lim GP, Calon F, Morihara T, Yang F, Teter B, Ubeda O, Salem N Jr, Frautschy SA, Cole GM. A diet enriched with the omega-3 fatty acid docosahexaenoic acid reduces amyloid burden in an aged Alzheimer mouse model. *J. Neurosci.* 2005; 25: 3032-40.
- Lipton SA, Rosenberg PA. Excitatory amino acids as a final common pathway for neurologic disorders. *N. Engl. J. Med.* 1994; 330: 613-22.
- Lombardi VR, García M, Rey L, Cacabelos R. Characterization of cytokine production, screening of lymphocyte subset patterns and *in vitro* apoptosis in healthy and Alzheimer's disease (AD) individuals. *J. Neuroimmunol.* 1999; 97: 163-71.
- Lorenzo A, Yuan M, Zhang Z, Paganetti PA, Sturchler-Pierrat C, Staufenbiel M, Mautino J, Vigo FS, Sommer B, Yankner BA. Amyloid beta interacts with the amyloid precursor protein: a potential toxic mechanism in Alzheimer's disease. *Nat. Neurosci.* 2000; 3: 460-4.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 1951; 193: 265-75.
- Lowe SL, Francis PT, Procter AW, Palmer AM, Davison AN, Bowen DM. Gamma-aminobutyric acid concentration in brain tissue at two stages of Alzheimer's disease. *Brain* 1988; 111: 785-99.
- Lund EK, Harvey LJ, Ladha S, Clark DC, Johnson IT. Effects of dietary fish oil supplementation on the phospholipid composition and fluidity of cell membranes from human volunteers. *Ann. Nutr. Metab.* 1999; 43: 290-300.
- Löffler J, Huber G. Modulation of β -amyloid precursor protein secretion in differentiated and nondifferentiated cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1993; 195: 97-103.
- Luthra K, Tripathi M, Grover R, Dwivedi M, Kumar A, Dey AB. Apolipoprotein E gene polymorphism in Indian patients with Alzheimer's disease and vascular dementia. *Dement. Geriatr. Cogn. Disord.* 2004; 17: 132-5.
- Mahley RW. Apolipoprotein E: cholesterol transport protein with expanding role in cell biology. *Science* 1988; 240: 622-30.
- Mahley RW, Weisgraber KH, Huang Y. Apolipoprotein E4: a causative factor and therapeutic target in neuropathology, including Alzheimer's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2006a; 103: 5644-51.
- Mahley RW, Huang Y, Weisgraber KH. Putting cholesterol in its place: apoE and reverse cholesterol transport. *J. Clin. Invest.* 2006b; 116: 1226-9.
- Malberg JE, Eisch AJ, Nestler EJ, Duman RS. Chronic antidepressant treatment increases neurogenesis in adult hippocampus. *J. Neurosci.* 2000; 20: 9104-10.
- Mann DM, Royston MC, Ravindra CR. Some morphometric observations on the brains of patients with Down's syndrome: their relationship to age and dementia. *J. Neurol. Sci.* 1990; 99: 153-64.
- Mann CD, Vu TB, Hrdina PD. Protein kinase C in rat brain cortex and hippocampus: effect of repeated administration of fluoxetine and desipramine. *Br. J. Pharmacol.* 1995; 115: 595-600.
- Marasciulo FL, Montagnani M, Potenza MA. Endothelin-1: the yin and yang on vascular function. *Curr. Med. Chem.* 2006; 13:1655-65.
- Maruyama K, Kametani F, Usami M, Yamao-Harigaya W, Tanaka K. "Secretase," Alzheimer amyloid protein precursor secreting enzyme is not sequence-specific. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1991; 179: 1670-6.
- Masliah E. Mechanisms of synaptic dysfunction in Alzheimer's disease. *Histol. Histopathol.* 1995; 10: 509-19.
- Masliah E, Mallory M, Veinbergs I, Miller A, Samuel W. Alterations in apolipoprotein E expression during aging and neurodegeneration. *Prog. Neurobiol.* 1996; 50: 493-503.
- Masliah E, Westland CE, Rockenstein EM., Abraham CR, Mallory M, Veinberg I, Sheldon, E, Mucke L. Amyloid precursor proteins protect neurons of transgenic mice against acute and chronic excitotoxic injuries *in vivo*. *Neuroscience* 1997; 78: 135-46.
- Mason M. The kynurenine aminotransferase of rat kidney. *J. Biol. Chem.* 1954; 211, 839-44.
- Mattson MP, Barger SW, Cheng B, Lieberburg I, Smith-Swintosky VL, Rydel RE. Beta-Amyloid precursor protein metabolites and loss of neuronal Ca^{2+} homeostasis in Alzheimer's disease. *Trends Neurosci.* 1993; 16: 409-14.
- Mattson MP. Cellular actions of β -amyloid precursor protein and its soluble and fibrillogenic derivatives. *Physiol. Rev.*

- 1997; 77: 1081-132.
- Mattson MP. Oxidative stress, perturbed calcium homeostasis, and immune dysfunction in Alzheimer's disease. *J. Neurovirol.* 2002; 8: 539-50.
- Mattson MP. Pathways towards and away from Alzheimer's disease. *Nature* 2004; 430: 631-9.
- Mayhan WG. Cellular mechanisms by which tumor necrosis factor-alpha produces disruption of the blood-brain barrier. *Brain Res.* 2002; 927:144-52.
- McConathy WJ, Alaupovic P. Isolation and partial characterization of apolipoprotein D, a new protein moiety of the human plasma lipoprotein system. *FEBS Lett.* 1973; 37: 178-82.
- McConathy, WJ, Alaupovic, P. Studies on the isolation and partial characterization of apolipoprotein D and lipoprotein D of human plasma. *Biochemistry* 1976; 15: 515-20.
- McConathy WJ, Alaupovic P. Isolation and characterization of other apolipoproteins. *Meth. Enzymol.* 1986; 128: 297-310.
- McGeer PL, McGeer EG. The possible role of complement activation in Alzheimer's disease. *Trends Mol. Med.* 2002; 8: 519-23.
- McKhann G, Drachman D, Folstein M, Katzman R, Price D, Stadlan EM. Clinical diagnosis of Alzheimer's disease: report of the NINCDS-ADRDA Work Group under the auspices of Department of Health and Human Services Task Force on Alzheimer's Disease. *Neurology* 1984; 34: 939-44.
- Mecocci P, MacGarvey U, Beal MF. Oxidative damage to mitochondrial DNA is increased in Alzheimer's disease. *Ann. Neurol.* 1994; 36: 747-51.
- Mecocci P, Polidori MC, Ingegneri T, Cherubini A, Chionne F, Cecchetti R, Senin U. Oxidative damage to DNA in lymphocytes from AD patients. *Neurology* 1998; 51: 1014-7.
- Menashi S, Authi KS, Carey F, Crawford N. Characterization of the calcium-sequestering process associated with human platelet intracellular membranes isolated by free-flow electrophoresis. *Biochem. J.* 1984; 222: 413-7.
- Mesulam MM, Geula C, Moran MA. Anatomy of cholinesterase inhibition in Alzheimer's disease: effect of physostigmine and tetrahydroaminoacridine on plaques and tangles. *Ann. Neurol.* 1987; 22: 683-91.
- Meredith EJ, Chamba A, Holder MJ, Barnes NM, Gordon J. Close encounters of the monoamine kind: immune cells betray their nervous disposition. *Immunology* 2005; 115: 289-95.
- Merriam AE, Aronson MK, Gaston P, Wey SL, Katz I. The psychiatric symptoms of Alzheimer's disease. *J. Am. Geriatr. Soc.* 1988; 36: 7-12.
- Michikawa M, Fan QW, Isobe I, Yanagisawa K. Apolipoprotein E exhibits isoform-specific promotion of lipid efflux from astrocytes and neurons in culture. *J. Neurochem.* 2000; 74: 1008-16.
- Migliore L, Fontana I, Cognato R, Coppede F, Siciliano G, Murri L. Searching for the role and the most suitable biomarkers of oxidative stress in Alzheimer's disease and in other neurodegenerative diseases. *Neurobiol. Aging* 2005; 26: 587-95.
- Mimori Y, Nakamura S, Yukawa M. Abnormalities of acetylcholinesterase in Alzheimer's disease with special reference to effect of acetylcholinesterase inhibitor. *Behav. Brain Res.* 1997; 83: 25-30.
- Mirnes K, Levitt P, Lewis DA. Critical appraisal of DNA microarrays in psychiatric genomics. *Biol. Psychiatry* 2006; 60: 163-76.
- Mirra SS, Heyman A, McKeel D, Sumi SM, Crain BJ, Brownlee LM, Vogel FS, Hughes JP, van Belle G, Berg L. The Consortium to Establish a Registry for Alzheimer's Disease (CERAD). Part II. Standardization of the neuropathologic assessment of Alzheimer's disease. *Neurology* 1991; 41: 479-86.
- Miyamoto S, Asakura M, Sasuga Y, Imafuku J, Gamo Y, Osada K. Chronic antidepressant administration inhibits microtubule assembly in rat cerebral cortex. *Eur. Neuropsychopharmacol.* 1995; 5: 280.
- Miyata M, Smith JD. Apolipoprotein E allele-specific antioxidant activity and effects on cytotoxicity by oxidative insults and beta-amyloid peptides. *Nat. Genet.* 1996; 14: 55-61.
- Mizuno T, Nakata M, Naiki H, Michikawa M, Wang R, Haass C, Yanagisawa K. Cholesterol-dependent generation of a seeding amyloid beta-protein in cell culture. *J. Biol. Chem.* 1999; 274: 15110-4.
- Mooradian AD, Lung CC, Pinnas JL. Cholesterol enriched diet enhances malondialdehyde modification of proteins in cerebral microvessels of rabbits. *Neurosci. Lett.* 1995; 185: 211-3.
- Moore SA, Figard PH, Spector AA, Hart MN. Brain microvessels produce 12-hydroxyeicosatetraenoic acid. *J. Neurochem.* 1989; 53: 376-82.
- Morale MC, Batticane N, Cioni M, Marchetti B. Upregulation of lymphocyte beta-adrenergic receptor in Down's syndrome: a biological marker of a neuroimmune deficit. *J. Neuroimmunol.* 1992; 38: 185-98.
- Morell P, Jurevics H. Origin of cholesterol in myelin. *Neurochem. Res.* 1996; 21: 463-70.
- Moretti R, Torre P, Antonello RM, Pizzolato G. Atypical neuroleptics as a treatment of agitation and anxiety in Alzheimer's disease: risks or benefits. *Expert. Rev. Neurother.* 2006; 6: 705-10.
- Morimoto K, Kaneko T, Iijima K, Koizumi A. Proliferative kinetics and chromosome damage in trisomy 21 lymphocyte cultures exposed to gamma-rays and bleomycin. *Cancer Res.* 1984; 44: 1499-1504.
- Morishima-Kawashima M, Ihara Y. The presence of amyloid β -protein in the detergent-insoluble membrane compartment of human neuroblastoma cells. *Biochemistry* 1998; 37:

- 15247-53.
- Morishita S, Aoki S. Effects of tricyclic antidepressants on protein kinase C activity in rabbit and human platelets in vivo. *J. Affect. Disord.* 2002; 70: 329-32.
- Mórocz M, Kálmán J, Juhász A, Sinkó I, McGlynn AP, Downes CS, Janka Z, Raskó I. Elevated levels of oxidative DNA damage in lymphocytes from patients with Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* 2002; 23: 47-53.
- Moroney JT, Tang MX, Berglund L, Small S, Merchant C, Bell K, Stern Y, Mayeux R. Low-density lipoprotein cholesterol and the risk of dementia with stroke. *JAMA* 1999; 282: 254-60.
- Morris MC, Evans DA, Bienias JL, Tangney CC, Bennett DA, Wilson RS, Aggarwal N, Schneider J. Consumption of fish and n-3 fatty acids and risk of incident Alzheimer disease. *Arch. Neurol.* 2003; 60: 940-6.
- Mossner R, Lesch KP. Role of serotonin in the immune system and in neuroimmune interactions. *Brain Behav. Immun.* 1998; 12: 249-71.
- Muchova J, Sustrova M, Garaiova I, Liptakova A, Blazicek P, Kvasnicka P, Pueschel S, Durackova Z. Influence of age on activities of antioxidant enzymes and lipid peroxidation products in erythrocytes and neutrophils of Down syndrome patients. *Free Radic. Biol. Med.* 2001; 31: 499-508.
- Mullges W, Berg D, Schmidtke A, Weinacker B, Toyka KV. Early natural course of transient encephalopathy after coronary artery bypass grafting. *Crit. Care Med.* 2000; 28: 1808-11.
- Murata Y, Sun-Wada GH, Yoshimizu T, Yamamoto A, Wada Y, Futai M. Differential localization of the vacuolar H⁺ pump with G subunit isoforms (G1 and G2) in mouse neurons. *J. Biol. Chem.* 2002; 277: 36296-303.
- Muth EA, Haskins JT, Moyer JA, Husbands GE, Nielsen ST, Sigg EB. Antidepressant biochemical profile of the novel bicyclic compound Wy-45,030, an ethyl cyclohexanol derivative. *Biochem. Pharmacol.* 1986; 35: 4493-7.
- Myers RH, Schaefer EJ, Wilson PW, D'Agostino R, Ordovas JM, Espino A, Au R, White RF, Knoefel JE, Cobb JL, McNulty KA, Beiser A, Wolf PA. Apolipoprotein E epsilon4 association with dementia in a population-based study: The Framingham study. *Neurology* 1996; 46: 673-7.
- Nagy Z. Cell cycle-related protein expression in Alzheimer's disease and vascular disease. *Int. Psychogeriatr.* 2003; 15 Suppl 1: 77-9.
- Nagy Z. The last neuronal division: a unifying hypothesis for the pathogenesis of Alzheimer's disease. *J. Cell. Mol. Med.* 2005; 9: 531-41.
- Nakamura M, Masuda H, Horii J, Kuma K, Yokoyama N, Ohba T, Nishitani H, Miyata T, Tanaka M, Nishimoto T. When overexpressed, a novel centrosomal protein, RanBPM, causes ectopic microtubule nucleation similar to gamma-tubulin. *J. Cell Biol.* 1998; 143: 1041-52.
- Namba Y, Tsuchiya H, Ikeda K. Apolipoprotein B immunoreactivity in senile plaque and vascular amyloids and neurofibrillary tangles in the brains of patients with Alzheimer's disease. *Neurosci. Lett.* 1992; 134: 264-6.
- Nathan BP, Bellosta S, Sanan DA, Weisgraber KH, Mahley RW, Pitas RE. Differential effects of apolipoproteins E3 and E4 on neuronal growth in vitro. *Science* 1994; 264: 850-2.
- Németh A, Urbanics K, Tariska P, Kramer J, Füst G, Dinya E, Ábel T, Romics L, Pados G, Manfred H és mtsai. Molecular genetic markers of Alzheimer dementia. *Orv Hetil.* 1995; 136: 1931-5.
- Newman MF, Kirchner JL, Phillips-Bute B, Gaver V, Grocott H, Jones RH, Mark DB, Reves JG, Blumenthal JA. Longitudinal assessment of neurocognitive function after coronary-artery bypass surgery. *N. Engl. J. Med.* 2001; 344: 395-402.
- Nitsch RM, Deng M, Growdon JH, Wurtman RJ. Serotonin 5-HT_{2a} and 5-HT_{2c} receptors stimulate amyloid precursor protein ectodomain secretion. *J. Biol. Chem.* 1996; 271: 4188-94.
- Nitsch RM, Slack BE, Wurtman RJ, Growdon JH. Release of Alzheimer amyloid precursor derivatives stimulated by activation of muscarinic acetylcholine receptors. *Science* 1992; 258: 304-7.
- Noguchi S, Murakami K, Yamada N. Apolipoprotein E genotype and Alzheimer's disease. *Lancet* 1993; 342: 737.
- Notkola IL, Sulkava R, Pekkanen J, Erkinjuntti T, Ehnholm C, Kivinen P, Tuomilehto J, Nissinen A. Serum total cholesterol, apolipoprotein E epsilon 4 allele, and Alzheimer's disease. *Neuroepidemiology* 1998; 17: 14-20.
- O'Brien PJ, Alborn WE, Sloan JH, Ulmer M, Boodhoo A, Knierman MD, Schultze AE, Konrad RJ. The novel apolipoprotein A5 is present in human serum, is associated with VLDL, HDL, and chylomicrons, and circulates at very low concentrations compared with other apolipoproteins. *Clin. Chem.* 2005; 51: 351-9.
- Okuda S, Nishiyama N, Saito H, Katsuki H. 3-Hydroxykynurenine, an endogenous oxidative stress generator, causes neuronal cell death with apoptotic features and region selectivity. *J. Neurochem.* 1998; 70: 299-307.
- Olofsson SO, Boren J. Apolipoprotein B: a clinically important apolipoprotein which assembles atherogenic lipoproteins and promotes the development of atherosclerosis. *J. Intern. Med.* 2005; 258: 395-410.
- Ott BR, Grace J. Vascular dementia. *Med. Health R. I.* 1997; 80: 150-4.
- Ownby RL, Crocco E, Acevedo A, John V, Loewenstein D. Depression and risk for Alzheimer disease: systematic review, meta-analysis and meta-regression analysis. *Arch. Gen. Psychiatry* 2006; 63: 530-8.
- Pacher P, Kecskeméti V. Cardiovascular side effects of new antidepressants and antipsychotics: new drugs, old concerns? *Curr. Pharm. Des.* 2004; 10: 2463-75.

- Pallister C, Jung SS, Shaw I, Nalbantoglu J, Gauthier S, Cashman NR. Lymphocyte content of amyloid precursor protein is increased in Down's syndrome and aging. *Neurobiol. Aging* 1997; 18: 97-103.
- Panegyres PK. The functions of the amyloid precursor protein gene. *Rev. Neurosci.* 2001; 12: 1-39.
- Papassotiropoulos A, Lutjohann D, Bagli M, Locatelli S, Jessen F, Rao ML, Maier W, Bjorkhem I, von Bergmann K, Heun R. Plasma 24S-hydroxycholesterol: a peripheral indicator of neuronal degeneration and potential state marker for Alzheimer's disease. *Neuroreport* 2000; 11: 1959-62.
- Papassotiropoulos A, Lutjohann D, Bagli M, Locatelli S, Jessen F, Buschfort R, Ptak U, Bjorkhem I, von Bergmann K, Heun R. 24S-hydroxycholesterol in cerebrospinal fluid is elevated in early stages of dementia. *J. Psychiatr. Res.* 2002; 36: 27-32.
- Park E, Alberti J, Mehta P, Dalton A, Sersen E, Schuller-Levis G. Partial impairment of immune functions in peripheral blood leukocytes from aged men with Down's syndrome. *Clin. Immunol.* 2000; 95: 62-9.
- Parkin ET, Turner AJ, Hooper NM. Amyloid precursor protein, although partially detergent-insoluble in mouse cerebral cortex, behaves as an atypical lipid raft protein. *Biochem. J.* 1999; 344: 23-30.
- Parshad RP, Sanford KK, Price FM, Melnick LK, Nee LE, Schapiro MB, Taron E, Robbin JH. Fluorescent light-induced chromatid breaks distinguish Alzheimer disease cells from normal cells in tissue culture. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1996; 93: 5146-50.
- Pasinetti GM. Use of cDNA microarray in the search for molecular markers involved in the onset of Alzheimer's disease dementia. *J. Neurosci. Res.* 2001; 65: 471-6.
- Pastore A, Tozzi G, Gaeta LM., Giannotti A, Bertini E, Federici G, Digilio MC, Piemonte F. Glutathione metabolism and antioxidant enzymes in children with Down syndrome. *J. Pediatr.* 2003; 142: 583-5.
- Patel RC, Lange D, McConathy WJ, Patel YC, Patel SC. Astrocytes synthesize and secrete the lipophilic ligand carrier apolipoprotein D. *Neuroreport* 1995; 6: 653-7.
- Patrignani P, Tacconelli S, Sciulli MG, Capone ML. New insights into COX-2 biology and inhibition. *Brain Res. Rev.* 2005; 48: 352-9.
- Paul SM, Purdy RH. Neuroactive steroids. *FASEB J.* 1992; 6: 2311-22.
- Peacock ML, Fink JK. ApoE epsilon 4 allelic association with Alzheimer's disease: independent confirmation using denaturing gradient gel electrophoresis. *Neurology* 1994; 44: 339-41.
- Pedro-Botet J, Senti M, Nogues X, Rubies-Prat J, Roquer J, D'Olhaberriague L, Olive J. Lipoprotein and apolipoprotein profile in men with ischemic stroke. Role of lipoprotein(a), triglyceride-rich lipoproteins, and apolipoprotein E polymorphism. *Stroke* 1992; 23: 1556-62.
- Peila R, White LR, Petrovich H, Masaki K, Ross GW, Havlik RJ, Launer LJ. Joint effect of the APOE gene and midlife systolic blood pressure on late-life cognitive impairment: the Honolulu-Asia aging study. *Stroke* 2001; 32: 2882-9.
- Peitsch MC, Boguski MS. Is apolipoprotein D a mammalian bilin-binding protein? *New Biol.* 1990; 2: 197-206.
- Peng M, Huang L, Xie ZJ, Huang WH, Askari A. Oxidant-induced activations of nuclear factor-kappa B and activator protein-1 in cardiac myocytes. *Cell. Mol. Biol. Res.* 1995; 41: 189-97.
- Perry G, Smith MA. Is oxidative damage central to the pathogenesis of Alzheimer disease? *Acta Neurol. Belg.* 1998; 98: 175-9.
- Perry RT, Collins JS, Harrell LE, Acton RT, Go RC. Investigation of association of 13 polymorphisms in eight genes in southeastern African American Alzheimer disease patients as compared to age-matched controls. *Am. J. Med. Genet.* 2001; 105: 332-42.
- Phillis JW, Horrocks LA, Farooqui AA. Cyclooxygenases, lipoxygenases, and epoxygenases in CNS: Their role and involvement in neurological disorders. *Brain Res. Rev.* 2006; Apr 26; [Epub ahead of print]
- Piletz JE, Sarasua M, Whitehouse P, Chotani M. Intracellular membranes are more fluid in platelets of Alzheimer's disease patients. *Neurobiol. Aging* 1991; 12: 401-6.
- Pitas RE, Innerarity TL, Weinstein JN, Mahley RW. Acetoacetylated lipoproteins used to distinguish fibroblasts from macrophages in vitro by fluorescence microscopy. *Arteriosclerosis* 1981; 1: 177-85.
- Pitas RE, Boyles JK, Lee SH, Hui D, Weisgraber KH. Lipoproteins and their receptors in the central nervous system. Characterization of the lipoproteins in cerebrospinal fluid and identification of apolipoprotein B, E (LDL) receptors in the brain. *J. Biol. Chem.* 1987a; 262: 14352-60.
- Pitas RE, Boyles JK, Lee SH, Foss D, Mahley WR. Astrocytes synthesize apolipoprotein E and metabolize apolipoprotein E-containing lipoproteins. *Biochim. Biophys. Acta* 1987b; 917: 148-61.
- Placer ZA, Cushman LL, Johnson BC. Estimation of product of lipid peroxidation (malonyl dialdehyde) in biochemical systems. *Anal. Biochem.* 1966; 16: 359-64.
- Poirier J, Baccichet A, Dea D, Gauthier S. Cholesterol synthesis and lipoprotein reuptake during synaptic remodelling in hippocampus in adult rats. *Neuroscience* 1993; 55: 81-90.
- Poirier J, Delisle MC, Quirion R, Aubert I, Farlow M, Lahiri D, Hui S, Bertrand P, Nalbantoglu J, Gilfix BM, Gauthier S. Apolipoprotein E4 allele as a predictor of cholinergic deficits and treatment outcome in Alzheimer disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1995; 92: 12260-4.
- Poirier J. Apolipoprotein E and Alzheimer's disease. A role in amyloid catabolism. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2000; 924: 81-90.

- Pratico D, Uryu K, Leight S, Trojanowski JQ, Lee VM. Increased lipid peroxidation precedes amyloid plaque formation in an animal model of Alzheimer amyloidosis. *J. Neurosci.* 2001; 21: 4183-7.
- Provost PR, Weech PK, Tremblay NM, Marcel YL, Rassart E. Molecular characterization and differential mRNA tissue distribution of rabbit apolipoprotein D. *J. Lipid Res.* 1990; 31: 2057-65.
- Provost PR, Villeneuve L, Weech PK, Milne RW, Marcel YL, Rassart E. Localization of the major sites of rabbit apolipoprotein D gene transcription by in situ hybridization. *J. Lipid Res.* 1991; 32: 1959-70.
- Puri V, Watanabe R, Dominguez M, Sun X, Wheatley CL, Marks DL, Pagano RE. Cholesterol modulates membrane traffic along the endocytic pathway in sphingolipid-storage diseases. *Nat. Cell Biol.* 1999; 1: 386-8.
- Puskas LG, Zvara A, Hackler L Jr, Micsik T, van Hummelen P. Production of bulk amounts of universal RNA for DNA microarrays. *Biotechniques* 2002; 33: 898-900.
- Raber J, Wong D, Yu GQ, Buttini M, Mahley RW, Pitas RE, Mucke L. Apolipoprotein E and cognitive performance. *Nature* 2000; 404: 352-4.
- Raber J, Huang Y, Ashford JW. ApoE genotype accounts for the vast majority of AD risk and AD pathology. *Neurobiol. Aging* 2004; 25: 641-50.
- Rabins PV, Lyketsos CG. Antipsychotic drugs in dementia: what should be made of the risks? *JAMA* 2005; 294: 1963-5.
- Racchi M, Baetta R, Salvietti N, Ianna P, Franceschini G, Paoletti R, Fumagalli R, Govoni S, Trabucchi M, Soma M. Secretory processing of amyloid precursor protein is inhibited by increase in cellular cholesterol content. *Biochem. J.* 1997; 322: 893-8.
- Raiha I, Kaprio J, Koskenvuo M, Rajala T, Sourander L. Dementia in twins. *Lancet* 1996; 347: 1706.
- Rajna P, Tariska P. *Az idős kor neuropszichiátriája.* B+V Lap és Könyvkiadó Kft., Budapest, 2000.
- Rakonczay Z, Vincendon G, Zanetta JP. Heterogeneity of rat brain acetylcholinesterase: a study by gel filtration and gradient centrifugation. *J. Neurochem.* 1981; 37: 662-9.
- Rakonczay Z. Potencies and selectivities of inhibitors of acetylcholinesterase and its molecular forms in normal and Alzheimer's disease brain. *Acta Biol. Hung.* 2003; 54: 183-9.
- Ramassamy C, Averill D, Beffert U, Bastianetto S, Theroux L, Lussier-Cacan S, Cohn JS, Christen Y, Davignon J, Quirion R, Poirier J. Oxidative damage and protection by antioxidants in the frontal cortex of Alzheimer's disease is related to the apolipoprotein E genotype. *Free Rad. Biol. Med.* 1999; 27: 544-53.
- Rasenick MM, Chen J, Chatuverdi G. Protein coupling, but not G protein content, is altered by chronic antidepressant treatment. *Biol. Psychiatry* 1997; 42 Suppl 1: 204S.
- Raskind MA, Peskind ER, Wessel T, Yuan W. Galantamine in AD: A 6-month randomized, placebo-controlled trial with a 6-month extension. The Galantamine USA-1 Study Group. *Neurology* 2000; 54: 2261-8.
- Raygani AV, Zahrai M, Soltanzadeh A, Doosti M, Javadi E, Pourmotabbed T. Analysis of association between butyrylcholinesterase K variant and apolipoprotein E genotypes in Alzheimer's disease. *Neurosci. Lett.* 2004; 371: 142-6.
- Reiser G, Donié F. Endothelin induces a rise of inositol 1,4,5-triphosphate, inositol 1,3,4,5-tetrakisphosphate levels and of cytosolic Ca^{2+} activity in neural cell lines. *Eur. J. Neurosci.* 1990; 2: 769-75.
- Rigaud AS, Traykov L, Caputo L, Guelfi MC, Latour F, Couderc R, Moulin F, de Rotrou J, Forette F, Boller F. The apolipoprotein E epsilon4 allele and the response to tacrine therapy in Alzheimer's disease. *Eur. J. Neurol.* 2000; 7: 255-8.
- Roach GW, Kanchuger M, Mangano CM, Newman M, Nussmeier N, Wolman R, Aggarwal A, Marschall K, Graham SH, Ley C. Adverse cerebral outcomes after coronary bypass surgery. Multicenter Study of Perioperative Ischemia Research Group and the Ischemia Research and Education Foundation Investigators. *N. Engl. J. Med.* 1996; 335: 1857-63.
- Robbins JH, Otsuka F, Tarone RE, Polinsky RJ, Brumback RA, Nee LE. Parkinson's disease and Alzheimer's disease: hypersensitivity to X-rays in cultured cell lines. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 1985; 48: 916-23.
- Rockenstein EM, McConlogue L, Tan H, Power M, Masliah E, Mucke L. Levels and alternative splicing of amyloid beta protein precursor (APP) transcripts in brains of APP transgenic mice and humans with Alzheimer's disease. *J. Biol. Chem.* 1995; 270: 28257-67.
- Rockwood K, Kirkland S, Hogan DB, MacKnight C, Merry H, Verreault R, Wolfson C, McDowell I. Use of lipid-lowering agents, indication bias, and the risk of dementia in community-dwelling elderly people. *Arch. Neurol.* 2002; 59: 223-7.
- Roheim PS, Carey M, Forte T, Vega GL. Apolipoproteins in human cerebrospinal fluid. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1979; 76: 4646-9.
- Roher AE, Esh C, Kokjohn TA, Kalback W, Luehrs DC, Seward JD, Sue LI, Beach TG. Circle of Willis atherosclerosis is a risk factor for sporadic Alzheimer's disease. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2003; 23: 2055-62.
- Roks G, Cruts M, Houwing-Duistermaat JJ, Dermaut B, Serneels S, Havekes LM, Hofman A, Breteler MM, Van Broeckhoven C, van Duijn CM. Effect of the APOE-491A/T promoter polymorphism on apolipoprotein E levels and risk of Alzheimer disease: The Rotterdam Study. *Am. J. Med. Genet.* 2002; 114: 570-3.
- Roman GC, Tatemichi TK, Erkinjuntti T, Cummings JL, Masdeu JC, Garcia JH, Amaducci L, Orgogozo JM, Brun A, Hofman A. Vascular dementia: diagnostic criteria for research studies. Report of the NINDS-AIREN International

- Workshop. *Neurology* 1993; 43: 250-60.
- Romas SN, Tang MX, Berglund L, Mayeux R. APOE genotype, plasma lipids, lipoproteins, and AD in community elderly. *Neurology* 1999; 53: 517-21.
- Roses AD, Saunders AM, Corder EH, Pericak-Vance MA, Han SH, Einstein G, Hulette C, Schmechel DE, Holsti M, Huang D. Influence of the susceptibility genes apolipoprotein E-epsilon 4 and apolipoprotein E-epsilon 2 on the rate of disease expressivity of late-onset Alzheimer's disease. *Arzneimittelforschung* 1995; 45: 413-7.
- Rossi L, Squitti R, Pasqualetti P, Marchese E, Cassetta E, Forastiere E, Rotilio G, Rossini PM, Finazzi-Agro A. Red blood cell copper, zinc superoxide dismutase activity is higher in Alzheimer's disease and is decreased by D-penicillamine. *Neurosci. Lett.* 2002; 329: 137-40.
- Rossor MN, Garrett NJ, Johnson AL, Mountjoy CQ, Roth M, Iversen LL. A post-mortem study of the cholinergic and GABA systems in senile dementia. *Brain* 1982; 105: 313-30.
- Ruhlen M. *A Guide to the World's Languages. Vol 1: Classification.* 1987. Stanford University Press, Stanford, CA.
- Russo C, Angelini G, Dapino D, Piccini A, Piombo G, Schettini G, Chen S, Teller JK, Zaccheo D, Gambetti P, Tabaton M. Opposite roles of apolipoprotein E in normal brains and in Alzheimer's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1998; 95: 15598-602.
- Russo-Neustadt A, Beard RC, Cotman CW. Exercise, antidepressant medications, and enhanced brain derived neurotrophic factor expression. *Neuropsychopharmacology* 1999; 21: 679-82.
- Rustemeijer C, Schouten JA, Voerman HJ, Beynen AC, Donker AJ, Heine RJ. Is pseudocholinesterase activity related to markers of triacylglycerol synthesis in Type II diabetes mellitus? *Clin. Sci. (Lond).* 2001; 101: 29-35.
- Saez-Valero J, Fodero LR, Sjogren M, Andreasen N, Amici S, Gallai V, Vanderstichele H, Vanmechelen E, Parnetti L, Blennow K, Small DH. Glycosylation of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase changes as a function of the duration of Alzheimer's disease. *J. Neurosci. Res.* 2003; 72: 520-6.
- Sadowitz PD, Setty BN, Stuart M. The platelet cyclooxygenase metabolite 12-L-hydroxy-5, 8, 10-hepta-decatienoic acid (HHT) may modulate primary hemostasis by stimulating prostacyclin production. *Prostaglandins* 1987; 34: 749-63.
- Saheki AT, Terasaki T, Tamai I, Tsuji A. In vivo and in vitro blood-brain barrier transport of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A (HMG-CoA) reductase inhibitors. *Pharm. Res.* 1994; 11: 305-11.
- Sakoda S, Kuriyama M, Osame M, Takahashi K, Yamano T, Sasaki I, Matsunaga A. Apolipoprotein E epsilon4. *Neurology* 1994; 44: 2420.
- Sakurai H, Shigemori N, Hisada Y, Ishizuka T, Kawashima K, Sugita T. Suppression of NF-kappa B and AP-1 activation by glucocorticoids in experimental glomerulonephritis in rats: molecular mechanisms of anti-nephritic action. *Biochim. Biophys. Acta* 1997; 1362: 252-62.
- Sambamurti K, Kinsey R, Maloney B, Ge YW, Lahiri DK. Gene structure and organization of the human beta-secretase (BACE) promoter. *FASEB J.* 2004; 18: 1034-6.
- Sanan DA, Newland DL, Tao R, Marcovina S, Wang J, Mooser V, Hammer RE, Hobbs HH. Low density lipoprotein receptor-negative mice expressing human apolipoprotein B-100 develop complex atherosclerotic lesions on a chow diet: no accentuation by apolipoprotein(a). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1998; 95: 4544-9.
- Sankaram MB, Thompson TE. Modulation of phospholipid acyl chain order by cholesterol. A solid-state ²H nuclear magnetic resonance study. *Biochemistry* 1990; 29: 10676-84.
- Sano M, Ernesto C, Thomas RG, Klauber MR, Schafer K, Grundman M, Woodbury P, Growdon J, Cotman CW, Pfeiffer E, Schneider LS, Thal LJ. A controlled trial of selegiline, alpha-tocopherol, or both as treatment for Alzheimer's disease. The Alzheimer's Disease Cooperative Study. *N. Engl. J. Med.* 1997; 336: 1216-22.
- Santarelli L, Saxe M, Gross C, Surget A, Battaglia F, Dulawa S, Weisstaub N, Lee J, Duman R, Arancio O, Belzung C, Hen R. Requirement of hippocampal neurogenesis for the behavioral effects of antidepressants. *Science* 2003; 301: 805-9.
- Sapolsky RM. Stress and plasticity in the limbic system. *Neurochem. Res.* 2003; 28: 1735-42.
- Saunders AM, Hulette O, Welsh-Bohmer KA, Schmechel DE, Crain B, Burke JR, Alberts MJ, Strittmatter WJ, Breitner IC, Rosenberg C. Specificity, sensitivity, and predictive value of apolipoprotein-E genotyping for sporadic Alzheimer's disease. *Lancet* 1996; 348: 90-3.
- Saunders AM. Apolipoprotein E and Alzheimer disease: an update on genetic and functional analyses. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 2000; 59: 751-8.
- Sayer R, Law E, Connelly PJ, Breen KC. Association of a salivary acetylcholinesterase with Alzheimer's disease and response to cholinesterase inhibitors. *Clin. Biochem.* 2004; 37: 98-104.
- Scacchi R, De Bernardini L, Mantuano E, Donini LM, Vilardo T, Corbo RM. Apolipoprotein E (apoE) allele frequencies in late-onset sporadic Alzheimer's disease (AD) mixed dementia and vascular dementia; lack of association of epsilon 4 allele with AD in Italian octogenarian patients. *Neurosci. Lett.* 1995; 201: 231-4.
- Schindowski K, Kratzsch T, Peters J, Steiner B, Leutner S, Touchet N, Maurer K, Czech C, Pradier L, Frolich L, Muller WE, Eckert A. Impact of aging: sporadic, and genetic risk factors on vulnerability to apoptosis in Alzheimer's disease. *Neuromol. Med.* 2003; 4: 161-78.
- Schmechel DE, Saunders AM, Strittmatter WJ, Crain BJ, Hulette CM, Joo SH, Pericak-Vance MA, Goldgaber D, Roses AD. Increased amyloid beta-peptide deposition in cerebral cortex as a consequence of apolipoprotein E genotype in late-onset Alzheimer disease. *Proc. Natl. Acad.*

- Sci. USA 1993; 90: 9649-53.
- Schmitt FA, Estus S. Alzheimer's disease genetic susceptibility and causality: what is ApoE's impact? *Neurobiol. Aging* 2004; 25: 661-2.
- Schneider LS, Dagerman KS, Insel P. Risk of death with atypical antipsychotic drug treatment for dementia: meta-analysis of randomized placebo-controlled trials. *JAMA* 2005; 294: 1934-43.
- Scholefield Z, Yates EA, Wayne G, Amour A, McDowell W, Turnbull JE. Heparan sulfate regulates amyloid precursor protein processing by BACE1, the Alzheimer's beta-secretase. *J. Cell Biol.* 2003; 163: 97-107.
- Schreck R, Albermann K, Baeuerle PA. Nuclear factor kappa B: an oxidative stress-responsive transcription factor of eukaryotic cells. *Free Radic. Res. Commun.* 1992; 17: 221-37.
- Schuessel K, Leutner S, Cairns NJ, Muller WE, Eckert A. Impact of gender on upregulation of antioxidant defence mechanisms in Alzheimer's disease brain. *J. Neural Transm.* 2004; 111: 1167-82.
- Scott HD, Laake K. Statins for the prevention of Alzheimer's disease. *Cochrane Database Syst. Rev.* 2001; 4: CD003160.
- Seeberg E, Eide L, Bjoras M. The base excision repair pathway. *Trends Biochem. Sci.* 1995; 20: 391-7.
- Seguin D, Desforges M, Rassart E. Molecular characterisation and differential mRNA tissue distribution of mouse apolipoprotein D. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 1995; 30: 242-50.
- Seidl R, Greber S, Schuller E, Bernert G, Cairns N, Lubec G. Evidence against increased oxidative DNA-damage in Down syndrome. *Neurosci. Lett.* 1997; 235: 137-40.
- Selkoe DJ. Normal and abnormal biology of the beta-amyloid precursor protein. *Annu. Rev. Neurosci.* 1994; 17: 489-517.
- Selkoe DJ, Lansbury PJ. *Biochemistry of Alzheimer's and prion diseases. In Basic Neurochemistry: Molecular, Cellular and Medical Aspects.* Siegel GJ, Agranoff BW, Albers RW, Fisher SK, Uhler MD (eds) Lippincott-Raven New York. 1999; pp. 949-68.
- Selkoe DJ. Clearing the brain's amyloid cobwebs. *Neuron* 2001; 32: 177-80.
- Sepehrnia B, Kamboh MI, Adams-Campbell LL, Nwankwo M, Ferrell RE. Genetic studies of human apolipoproteins. VII. Population distribution of polymorphisms of apolipoproteins A-I, A-II, A-IV, C-II, E, and H in Nigeria. *Am. J. Hum. Genet.* 1988; 43: 847-53.
- Serra JA, Famulari AL, Kohan S, Marschoff ER, Dominguez RO, de Lustig ES. Copper-zinc superoxide dismutase activity in red blood cells in probable Alzheimer's patients and their first-degree relatives. *J. Neurol. Sci.* 1994; 122: 179-88.
- Shimano H, Ishibashi S, Murase T, Gotohda T, Yamada N, Takaku F, Ohtomo E. Plasma apolipoproteins in patients with multi-infarct dementia. *Atherosclerosis* 1989; 79: 257-60.
- Shimizu T, Watanabe A, Ogawara M, Mori H, Shirasawa T. Isoaspartate formation and neurodegeneration in Alzheimer's disease. *Arch. Biochem. Biophys.* 2000; 381: 225-34.
- Shivers BD, Hilbich C, Multhaup G, Salbaum M, Beyreuther K, Seeburg PH. Alzheimer's disease amyloidogenic glycoprotein: expression pattern in rat brain suggests a role in cell contact. *EMBO J.* 1988; 7: 1365-70.
- Sidera C, Parsons R, Austen B. Post-translational processing of beta-secretase in Alzheimer's disease. *Proteomics* 2005; 5: 1533-43.
- Siek GC, Katz LS, Fishman EB, Korosi TS, Marquis JK. Molecular forms of acetylcholinesterase in subcortical areas of normal and Alzheimer disease brain. *Biol. Psychiatry* 1990; 27: 573-80.
- Simons K, Ikonen E. Functional rafts in cell membranes. *Nature* 1997; 387: 569-72.
- Simons K, Toomre D. Lipid rafts and signal transduction. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2000; 1: 31-9.
- Simons K, Ehehalt R. Cholesterol, lipid rafts, and disease. *J. Clin. Invest.* 2002; 110: 597-603.
- Simons M, Keller P, De Strooper B, Beyreuther K, Dotti CG, Simons K. Cholesterol depletion inhibits the generation of beta-amyloid in hippocampal neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1998; 95: 6460-4.
- Simons M, Keller P, Schulz D. Cholesterol and Alzheimer's disease: is there a link? *Neurology* 2001; 57: 1089-93.
- Sing CF, Davignon J. Role of the apolipoprotein E polymorphism in determining normal plasma lipid and lipoprotein variation. *Am. J. Hum. Genet.* 1985; 37: 268-85.
- Sing CF, Davignon J, Smart EJ, Graf GA, McNiven MA, Sessa WC, Engelman JA, Scherer PE, Okamoto T, Lisanti MP. Caveolins, liquid-ordered domains, and signal transduction. *Mol. Cell. Biol.* 1999; 19: 7289-304.
- Singleton A, Myers A, Hardy J. The law of mass action applied to neurodegenerative disease: a hypothesis concerning the etiology and pathogenesis of complex diseases. *Hum. Mol. Genet.* 2004; 13 Spec No 1: R 123-6.
- Skovronsky DM, Lee VM, Pratico D. Amyloid precursor protein and amyloid beta peptide in human platelets. Role of cyclooxygenase and protein kinase C. *J. Biol. Chem.* 2001; 276: 17036-43.
- Slooter AJ, Cruts M, Hofman A, Koudstaal PJ, van der Kuip D, de Ridder MA, Witteman JC, Breteler MM, Van Broeckhoven C, van Duijn CM. The impact of APOE on myocardial infarction, stroke, and dementia: the Rotterdam Study. *Neurology* 2004; 62: 1196-8.
- Small GW, Ercoli LM, Silverman DH, Huang SC, Komo S, Bookheimer SY, Lavretsky H, Miller K, Siddarth P, Rasgon NL, Mazziotta JC, Saxena S, Wu HM, Mega MS, Cummings JL, Saunders AM, Pericak-Vance MA, Roses AD, Barrio JR,

- Phelps ME. Cerebral metabolic and cognitive decline in persons at genetic risk for Alzheimer's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2000; 97: 6037-42.
- Smart EJ, Graf GA, McNiven MA, Sessa WC, Engelman JA, Scherer PE, Okamoto T, Lisanti MP. Caveolins, liquid-ordered domains, and signal transduction. *Mol. Cell Biol.* 1999; 19: 7289-304.
- Smith KM, Lawn RM, Wilcox JN. Cellular localization of apolipoprotein D and lecithin:cholesterol acyltransferase mRNA in rhesus monkey tissues by in situ hybridization. *J. Lipid Res.* 1990; 31: 995-1004.
- Smythe GA, Poljak A, Bustamante S, Braga O, Maxwell A, Grant R, Sachdev P. ECNI GC-MS analysis of picolinic and quinolinic acids and their amides in human plasma, CSF, and brain tissue. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2003; 527: 705-12.
- Snow AD, Kinsella MG, Parks E, Sekiguchi RT, Miller JD, Kimata K, Wight TN. Differential binding of vascular cell-derived proteoglycans (perlecan, biglycan, decorin, and versican) to the beta-amyloid protein of Alzheimer's disease. *Arch. Biochem. Biophys.* 1995; 320: 84-95.
- Snow AD, Mar H, Nochlin D, Kimata K, Kato, M, Suzuki S, Hassell J, Wight TN. The presence of heparan sulfate proteoglycans in the neuritic plaques and congophilic angiopathy in Alzheimer's disease. *Am. J. Pathol.* 1988; 133: 456-63.
- Snowdon DA, Greiner LH, Mortimer JA, Riley KP, Greiner PA, Markesbery WR. Brain infarction and the clinical expression of Alzheimer disease. The Nun Study. *JAMA* 1997; 277: 813-7.
- Snowdon DA, Kemper SJ, Mortimer JA, Greiner LH, Wekstein DR, Markesbery WR. Linguistic ability in early life and cognitive function and Alzheimer's disease in late life. Findings from the Nun Study. *JAMA* 1996; 275: 528-32.
- Sola C, Garcia-Ladona FJ, Mengod G, Probst A, Frey P, Palacios JM. Increased levels of the Kunitz protease inhibitor-containing beta APP mRNAs in rat brain following neurotoxic damage. *Brain Res. Mol. Brain Res.* 1993; 17: 41-52.
- Sooksawate T, Simmonds MA. Effects of membrane cholesterol on the sensitivity of the GABA(A) receptor to GABA in acutely dissociated rat hippocampal neurones. *Neuropharmacology* 2001; 40: 178-84.
- Sparks DL. Coronary artery disease, hypertension, ApoE, and cholesterol: a link to Alzheimer's disease? *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1997; 826: 128-46.
- Sparks DL, Liu H, Gross DR, Scheff SW. Increased density of cortical apolipoprotein E immunoreactive neurons in rabbit brain after dietary administration of cholesterol. *Neurosci. Lett.* 1995; 187: 142-4.
- Sparks DL, Scheff SW, Hunsaker JC 3rd, Liu H, Landers T, Gross DR. Induction of Alzheimer-like beta-amyloid immunoreactivity in the brains of rabbits with dietary cholesterol. *Exp. Neurol.* 1994; 126: 88-94.
- Spires TL, Hyman BT. Transgenic models of Alzheimer's disease: learning from animals. *NeuroRx.* 2005; 2: 423-37.
- Starkstein SE, Petracca G, Chemerinski E, Kremer J. Syndromic validity of apathy in Alzheimer's disease. *Am. J. Psychiatry* 2001; 158: 872-7.
- Stefulj J, Jernej B, Cicin-Sain L, Rinner I, Schauenstein K. mRNA expression of serotonin receptors in cells of the immune tissues of the rat. *Brain Behav. Immun.* 2000; 14: 219-24.
- Stevenson RJ, Westermann J, Liebmann PM, Hörtnner M, Rinner I, Felsner P, Wölfler A, Schauenstein K. Prolonged α -adrenergic stimulation causes changes in leukocyte distribution and lymphocyte apoptosis in the rat. *J. Neuroimmunol.* 2001; 120: 50-7.
- Streit WJ, Kreutzberg GW. Lectin binding by resting and reactive microglia. *J. Neurocytol.* 1987; 16: 249-60.
- Strittmatter WJ, Weisgraber KH, Huang DY, Dong LM, Salvesen GS, Pericak-Vance M, Schmechel D, Saunders AM, Goldgaber D, Roses AD. Binding of human apolipoprotein E to synthetic amyloid beta peptide: isoform-specific effects and implications for late-onset Alzheimer disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1993; 90: 8098-102.
- Sulger J, Dumais-Huber C, Zerfass R, Henn FA, Aldenhoff JB. The calcium response of human T lymphocytes is decreased in aging but increased in Alzheimer's dementia. *Biol. Psychiatry* 1999; 45: 737-42.
- Suresh S, Yan Z, Patel RC, Patel YC, Patel SC. Cellular cholesterol storage in the Niemann-Pick disease type C mouse is associated with increased expression and defective processing of apolipoprotein D. *J. Neurochem.* 1998; 70: 242-51.
- Suzuki, T. Lipid rafts at postsynaptic sites: distribution, function and linkage to postsynaptic density. *Neurosci. Res.* 2002; 44: 1-9.
- Swan GE, LaRue A, Carmelli D, Reed TE, Fabsitz RR. Decline in cognitive performance in aging twin: heritability and biobehavioral predictors from National Heart Lung and Blood Institute Study. *Arch. Neurol.* 1992; 49: 476-81.
- Takeda M, Tatebayashi Y, Nishimura T. Change in the cytoskeletal system in fibroblasts from patients with familial Alzheimer's disease. *Prog. Neuro-Psychopharmacol. Biol. Psychiatry* 1992; 16: 317-28.
- Takeshita T, Ariizumi-Shibusawa C, Shimizu K, Hoshino H, Yamagata Z, Iijima S, Asaka A, Higurashi M. The effect of aging on cell-cycle kinetics and X-ray-induced chromosome aberrations in cultured lymphocytes from patients with Down syndrome. *Mutat. Res.* 1992; 275: 21-9.
- Takuma K, Yan SS, Stern DM, Yamada K. Mitochondrial dysfunction, endoplasmic reticulum stress, and apoptosis in Alzheimer's disease. *J. Pharmacol. Sci.* 2005; 97: 312-6.
- Tam CF, Walford RL. Alterations in cyclic nucleotides and cyclase-specific activities in T lymphocytes of aging normal humans and patients with Down's syndrome. *J. Immunol.* 1980; 125: 1665-70.

- Tamagno E, Bardini P, Obbili A, Vitali A, Borghi R, Zaccheo D, Pronzato MA, Danni O, Smith MA, Perry G, Tabaton M. Oxidative stress increases expression and activity of BACE in NT2 neurons. *Neurobiol. Dis.* 2002; 10: 279-88.
- Tan ZS, Seshadri S, Beiser A, Wilson PW, Kiel DP, Tocco M, D'Agostino RB, Wolf PA. Plasma total cholesterol level as a risk factor for Alzheimer disease: the Framingham Study. *Arch. Intern. Med.* 2003; 163: 1053-7.
- Tanaka S, Shiojiri S, Takahashi Y, Kitaguchi N, Ito H, Kameyama M, Kimura J, Nakamura S, Ueda K. Tissue-specific expression of three types of beta-protein precursor mRNA: enhancement of protease inhibitor harboring types in Alzheimer's disease brain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1989; 165: 1406-14.
- Tariot PN, Ryan JM, Porsteinsson AP, Loy R, Schneider LS. Pharmacologic therapy for behavioral symptoms of Alzheimer's disease. *Clin. Geriatr. Med.* 2001; 17: 359-76.
- Tariska P. *Alzheimer-kór*. Golden Book Kiadó, Budapest, 2000a.
- Tariska P. (szerk.) *Neuropszichiátria*. Medicina, Budapest, 2000b.
- Taylor JM, Lauer S, Elshourbagy N, Reardon C, Taxman E, Walker D, Chang D, Paik YK. Structure and evolution of human apolipoprotein genes: identification of regulatory elements of the human apolipoprotein E gene. *Ciba Found. Symp.* 1987; 130: 70-86.
- Terrisse L, Poirier J, Bertrand P, Merched A, Visvikis S, Siest G, Milne R, Rassart E. Increased levels of apolipoprotein D in cerebrospinal fluid and hippocampus of Alzheimer's patients. *J. Neurochem.* 1998; 71:1643-50.
- Thanos D, Maniatis T. NF-kappa B: a lesson in family values. *Cell* 1995; 80: 529-32.
- Thome J, Gewirtz JC, Sakai N, Zachariou V, Retz-Junginger P, Retz W, Duman RS, Rosler M. Polymorphisms of the human apolipoprotein E promoter and bleomycin hydrolase gene: risk factors for Alzheimer's dementia? *Neurosci. Lett.* 1999; 274: 37-40.
- Tohgi H, Abe T, Takahashi S, Saheki M, Kimura M. Indoleamine concentrations in cerebrospinal fluid from patients with Alzheimer type and Binswanger type dementias before and after administration of citalopram, a synthetic serotonin uptake inhibitor. *J. Neural. Transm. Park. Dis. Dement. Sect.* 1995; 9: 121-131.
- Tokuda T, Tamaoka A, Matsuno S, Sakurai S, Shimada H, Morita H, Ikeda S. Plasma levels of amyloid beta protein did not differ between subjects taking statins and not taking statins. *Ann. Neurol.* 2001; 49: 546-7.
- Tsankova NM, Berton O, Renthal W, Kumar A, Neve RL, Nestler EJ. Sustained hippocampal chromatin regulation in a mouse model of depression and antidepressant action. *Nat. Neurosci.* 2006; 9: 519-25.
- Tsuji A, Saheki A, Tamai I, Terasaki T. Transport mechanism of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors at the blood-brain barrier. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1993; 267: 1085-90.
- Ueberham U, Arendt T. The expression of cell cycle proteins in neurons and its relevance for Alzheimer's disease. *Curr. Drug Targets CNS Neurol. Disord.* 2005; 4: 293-306.
- Uhl GR, Grow RW. The burden of complex genetics in brain disorders. *Arch. Gen. Psychiatry* 2004; 61: 223-9.
- Ursini-Siegel J, Zhang W, Altmeyer A, Hatada EN, Do RK, Yagita H, Chen-Kiang S. TRAIL/Apo-2 ligand induces primary plasma cell apoptosis. *J. Immunol.* 2002; 169: 5505-13.
- Utsunomiya A, Owada Y, Yoshimoto T, Kondo H Localization of gene expression for phosphatidylinositol transfer protein in the brain of developing and mature rats. *Mol. Brain Res.* 1997; 45: 349-52.
- Xu Y, Bradham C, Brenner DA, Czaja MJ. Hydrogen peroxide-induced liver cell necrosis is dependent on AP-1 activation. *Am. J. Physiol.* 1997; 273: G795-803.
- Yamamoto Y, Yasuda M, Mori E, Maeda K. Failure to confirm a synergistic effect between the K-variant of the butyrylcholinesterase gene and the epsilon4 allele of the apolipoprotein gene in Japanese patients with Alzheimer's disease. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 1999; 67: 94-6.
- Yan SD, Yan SF, Chen X, Fu J, Chen M, Kuppusamy P, Smith MA, Perry G, Godman GC, Nawroth P, Zweiler JL, Stern D. Non-enzymatically glycated tau in Alzheimer's disease induces neuronal oxidant stress resulting in cytokine gene expression and release of amyloid beta-peptide. *Nat. Med.* 1995; 1: 693-9.
- Yao ZX, Papadopoulos V. Function of beta-amyloid in cholesterol transport: a lead to neurotoxicity. *FASEB J.* 2002; 16: 1677-9.
- Yerram NR, Moore SA, Spector AA. Eicosapentaenoic acid metabolism in brain microvessel endothelium: effect on prostaglandin formation. *J. Lipid Res.* 1989; 30: 1747-57.
- Yoshitake T, Kiyohara Y, Kato I, Ohmura T, Iwamoto H, Nakayama K, Ohmori S, Nomiya K, Kawano H, Ueda K. Incidence and risk factors of vascular dementia and Alzheimer's disease in a defined elderly Japanese population: the Hisayama Study. *Neurology* 1995; 45: 1161-8.
- Younkin SG, Goodridge B, Katz J, Lockett G, Nafziger D, Usiak MF, Younkin, LH. Molecular forms of acetylcholinesterase in Alzheimer's disease. *Fed. Proc.* 1986; 45: 2982-8.
- Valerio A, Boroni F, Benarese M, Sarnico I, Ghisi V, Bresciani LG, Ferrario M, Borsani G, Spano P, Pizzi M. NF-kappaB pathway: a target for preventing beta-amyloid (Abeta)-induced neuronal damage and Abeta42 production. *Eur. J. Neurosci.* 2006; 23: 1711-20.
- Van den Buuse M, Webber KM. Endothelin and dopamine release. *Prog. Neurobiol.* 2000; 60: 385-405.

- Van Nostrand WE, Schmaier AH, Farrow JS, Cunningham DD. Protease nexin-II (amyloid beta-protein precursor): a platelet alpha-granule protein. *Science* 1990; 248:745-8.
- Van Rensburg SJ, Carstens ME, Potocnik FC, Aucamp AK, Taljaard JJ, Koch KR. Membrane fluidity of platelets and erythrocytes in patients with Alzheimer's disease and the effect of small amounts of aluminium on platelet and erythrocyte membranes. *Neurochem. Res.* 1992; 17: 825-9.
- Veenstra-VanderWeele J, Anderson GM, Cook EH Jr. Pharmacogenetics and the serotonin system: initial studies and future directions. *Eur. J. Pharmacol.* 2000; 410: 165-181.
- Velez-Pardo C, Ospina GG, Jimenez del Rio M. A β _[25-35] peptide and iron promote apoptosis in lymphocytes by an oxidative stress mechanism: involvement of H₂O₂, caspase-3, NF- κ B, p53 and c-Jun. *Neurotoxicology* 2002; 23: 351-65.
- Verducci JS, Melfi VF, Lin S, Wang Z, Roy S, Sen CK. Microarray analysis of gene expression: considerations in data mining and statistical treatment. *Physiol. Genomics* 2006; 25: 355-63.
- Vina J, Lloret A, Orti R, Alonso D. Molecular bases of the treatment of Alzheimer's disease with antioxidants: prevention of oxidative stress. *Mol. Aspects Med.* 2004; 25: 117-23.
- Wada M, Kamata M, Aizu Y, Morita T, Hu J, Oyanagi K. Alteration of midkine expression in the ischemic brain of humans. *J. Neurol. Sci.* 2002; 67-73.
- Walker JM, Bowen WD, Walker FO, Matsumoto RR, De Costa B, Rice KC. Sigma receptors: biology and function. *Pharmacol. Rev.* 1990; 42: 355-401.
- Walker DG, Lue LF, Beach TG. Gene expression profiling of amyloid beta peptide-stimulated human post-mortem brain microglia. *Neurobiol. Aging* 2001; 22: 957-66.
- Walsh DT, Montero RM, Bresciani LG, Jen AY, Leclercq PD, Saunders D, El-Amir AN, Gbadamoshi L, Gentleman SM, Jen LS. Amyloid-beta peptide is toxic to neurons in vivo via indirect mechanisms. *Neurobiol. Dis.* 2002; 10: 20-7.
- Wang JC, Kwon JM, Shah P, Morris JC, Goate A. Effect of APOE genotype and promoter polymorphism on risk of Alzheimer's disease. *Neurology* 2000; 55: 1644-9.
- Wang B, Zhang C, Zheng W, Lu Z, Zheng C, Yang Z, Wang L, Jin F. Association between a T/C polymorphism in intron 2 of cholesterol 24S-hydroxylase gene and Alzheimer's disease in Chinese. *Neurosci. Lett.* 2004; 369: 104-7.
- Wang PS, Schneeweiss S, Avorn J, Fischer MA, Mogun H, Solomon DH, Brookhart MA. Risk of death in elderly users of conventional vs. atypical antipsychotic medications. *N. Engl. J. Med.* 2005; 353: 2335-41.
- Weidemann A, König G, Bunke D, Fischer P, Salbaum JM, Masters CL, Beyreuther K. Identification, biogenesis, and localization of precursors of Alzheimer's disease A4 amyloid protein. *Cell* 1989; 57: 115-26.
- Weisgraber KH, Mahley RW. Human apolipoprotein E. The Alzheimer's disease connection. *FASEB J.* 1996; 10: 1485-94.
- Wen Y, Onyewuchi O, Yang S, Liu R, Simpkins JW. Increased beta-secretase activity and expression in rats following transient cerebral ischemia. *Brain Res.* 2004; 1009: 1-8.
- White AR, Multhaup G, Galatis D, McKinstry WJ, Parker MW, Pipkorn R, Beyreuther K, Masters CL, Cappai R. Contrasting, species-dependent modulation of copper-mediated neurotoxicity by the Alzheimer's disease amyloid precursor protein. *J. Neurosci.* 2002; 22: 365-76.
- Widner B, Leblhuber F, Walli J, Tilz GP, Demel U, Fuchs D. Tryptophan degradation and immune activation in Alzheimer's disease. *J. Neural. Transm.* 2000; 107: 343-53.
- Wiebusch H, Poirier J, Seigny P, Schappert, K. Further evidence for a synergistic association between ApoE4 and BCHE-K in confirmed Alzheimer's disease. *Hum. Genet.* 1999; 104: 158-63.
- Wilson KE, Ryan MM, Prime JE, Pashby DP, Orange PR, O'Beirne G, Whateley JG, Bahn S, Morris CM. Functional genomics and proteomics: application in neurosciences. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 2004; 75: 529-38.
- Wolozin BL, Basaric-Keys J, Canter R, Li Y, Vanderputten D, Sunderland T. Differential regulation of APP secretion by apolipoprotein E3 and E4. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1996; 777: 322-6.
- Wolozin B. Cyp46 (24S-cholesterol hydroxylase): a genetic risk factor for Alzheimer disease. *Arch. Neurol.* 2003; 60: 16-8.
- Wright CI, Geula C, Mesulam MM. Neurological cholinesterases in the normal brain and in Alzheimer's disease: relationship to plaques, tangles, and patterns of selective vulnerability. *Ann. Neurol.* 1993; 34: 373-84.
- Wu RM, Murphy DL, Chiueh CC. Suppression of hydroxyl radical formation and protection of nigral neurons by 1-deprenyl (selegiline). *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1996; 786: 379-90.
- Wu HQ, Guidetti P, Goodman JH, Varasi M, Ceresoli-Borroni G, Speciale C, Scharfman HE, Schwarcz R. Kynurenergic manipulations influence excitatory synaptic function and excitotoxic vulnerability in the rat hippocampus in vivo. *Neuroscience* 2000; 97: 243-51.
- Zannis VI, Breslow JL. Human very low density lipoprotein apolipoprotein E isoprotein polymorphism is explained by genetic variation and posttranslational modification. *Biochemistry* 1981; 20: 1033-41.
- Zhu X, Raina AK, Lee HG, Casadesus G, Smith MA, Perry G. Oxidative stress signalling in Alzheimer's disease. *Brain Res.* 2004a; 1000: 32-9.
- Zhu X, Raina AK, Perry G, Smith MA. Alzheimer's disease: the two-hit hypothesis. *Lancet Neurol.* 2004b; 3: 219-26.

- Zhu D, Xiong WC, Mei L. Lipid rafts serve as a signaling platform for nicotinic acetylcholine receptor clustering. *J. Neurosci.* 2006; 26: 4841-51.
- Zimetbaum P, Frishman WH, Ooi WL, Derman MP, Aronson M, Gidez LI, Eder HA. Plasma lipids and lipoproteins and the incidence of cardiovascular disease in the very elderly. The Bronx Aging Study. *Arterioscler. Thromb.* 1992; 12: 416-23.
- Zitnanova I, Korytar P, Aruoma OI, Sustrova M, Garaiova I, Muchova J, Kalnovicova T, Pueschel S, Durackova Z. Uric acid and allantoin levels in Down syndrome: antioxidant and oxidative stress mechanisms? *Clin. Chim. Acta* 2004; 341: 139-46.
- Zlokovic BV. Neurovascular mechanisms of Alzheimer's neurodegeneration. *Trends Neurosci.* 2005; 28: 202-8.
- Zubenko GS. Hippocampal membrane alteration in Alzheimer's disease. *Brain Res.* 1986; 385: 115-21.
- Zubenko GS, Cohen BM, Boller F, Malinakova I, Keefe N, Chojnacki B. Platelet membrane abnormality in Alzheimer's disease. *Ann. Neurol.* 1987; 22: 237-44.
- Zubenko GS, Huff FJ, Becker J, Beyer J, Teply I. Cognitive function and platelet membrane fluidity in Alzheimer's disease. *Biol. Psychiatry* 1988; 24: 925-36.
- Zubenko GS. Endoplasmic reticulum abnormality in Alzheimer's disease: selective alteration in platelet NADH-cytochrome C reductase activity. *J. Geriatr. Psychiatry Neurol.* 1989; 2: 3-10.
- Zubenko GS, Stiffler S, Stabler S, Kopp U, Hughes HB, Cohen BM, Moossy J. Association of the apolipoprotein E epsilon 4 allele with clinical subtypes of autopsy-confirmed Alzheimer's disease. *Am. J. Med. Genet.* 1994; 54: 199-205.
- Zurutuza L, Verpillat P, Raux G, Hannequin D, Puel M, Belliard S, Michon A, Pothin Y, Camuzat A, Penet C, Martin C, Brice A, Campion D, Clerget-Darpoux F, Frebourg T. APOE promoter polymorphisms do not confer independent risk for Alzheimer's disease in a French population. *Eur. J. Hum. Genet.* 2000; 8: 713-6.
- Zwacka RM, Zhang Y, Zhou W, Halldorson J, Engelhardt JF. Ischemia/reperfusion injury in the liver of BALB/c mice activates AP-1 and nuclear factor kappaB independently of kappaB degradation. *Hepatology* 1998; 28: 1022-30.
- Zweig RM, Ross CA, Hedreen JC, Steele C, Cardillo JE, Whitehouse PJ, Folstein MF, Price DL. The neuropathology of aminergic nuclei in Alzheimer's disease. *Ann. Neurol.* 1988; 24: 233-42.

Ha szétszeded a rózsát, hasznos információid lesznek róla, de semmit sem fogsz tudni a rózsákról.
Anthony De Mello

10. Függelék

10.1. Módszertani összefoglaló

10.1.1. Vizsgálati személyek

Az egyes vizsgálati protokollokat a SZTE Humán Orvosbiológiai Kutatás- és Bizottsága hagyta jóvá. A vizsgálatok a résztvevő személyek, indokolt esetben hozzátartozók és gondviselők részletes tájékoztatása, a beleegyezési nyilatkozatok aláírása után kerültek sorra a Helsink Deklaráció és revízióinak figyelembe vételével.

Az AK klinikai valószínűségi diagnózisát a BNO-10, DSM-IV (1994) és a NINCDS-ADRDA (McKhann és mtsai 1984) diagnosztikus rendszerek kritériumai segítségével állapítottuk meg. A klinikai valószínűségi diagnózis neuropatológiai megerősítésére az esetek többségében nem volt lehetőség, ez csak néhány esetben történt meg. A vizsgálatainkban részt vett AK-os betegeket késői típusú, sporadikus AK alcsoportba tartozóknak tekintettük, mivel 65 éves életkor felett kezdték a demencia szindróma klinikai tüneteit mutatni, valamint az auto- és heteroanamnesztikus adatok szerint AK tekintetében nem fordult elő halmozódás családjukban.

A VD klinikai diagnózisát NINDS-AIREN kritériumok alapján állapítottuk meg (Roman és mtsai 1993). A módosított iszkémia skálát is felhasználtuk az AK és VD elkülönítésére (Hachinski és mtsai 1975).

A demenciák diagnosztikus protokolljainak megfelelően az AK-os és VD betegek esetében belgyógyászati, neurológiai, rutin klinikai kémiai laboratóriumi vérvizsgálatokat is végeztünk. A diagnózis megállapításához minden esetben figyelembe vettük a koponya CT és MR agyi képalkotó vizsgálatok eredményeit is. Számos beteg esetében agyi SPECT vizsgálat is készült.

Az AK és kontroll (KT) személyek agyának immunhisztokémiai vizsgálataihoz felhasznált agymintákat a SZTE Pszichiátriai Klinika Alzheimer-kór Kutatócsoportjának agybankjából, valamint az Osteopathic Medical Center, University of North Texas Health Science Center, Forth Worth, TX, USA patológiai laboratóriumának mintáiból választottuk ki. Az AK diagnózisát, illetve a KT személyek esetében az AK kizárását, a CERAD kritériumok szerint végeztük (Mirra és mtsai 1991).

A gyermekkori expresszív beszédfejlődés zavarának diagnózisa a BNO-10 és DSM-IV kritériumokon alapult és a kevert receptív – expresszív nyelvfejlődési zavarban szenvedők kizárására kerültek.

A DK diagnózisát kromoszóma analízissel állapítottuk meg, és minden vizsgálati

személy esetében a 21-es kromoszóma triszómiájának bizonyult. A DK gyermekek és felnőttek, valamint az életkor és nem szerint egyeztetett KT személyek a szegedi Dr. Waltner Károly Egészségügyi Gyermekotthon, a Fogyatékosok Nappali Intézete (Szeged) és az SZTE Gyermek- és Ifjúságpszichiátriai Osztályának gondozottjai közül kerültek beválogatásra. A kiskorúak és korlátozottan cselekvőképes személyek esetében a szülő, gondviselő, gondnok hozzájárulását is kértük a vizsgálatokhoz.

A 60 év feletti idős személyek esetében a MD diagnózisa a BNO-10 és a DSM-IV kritériumok szerint lett megállapítva. A depresszió és demencia szindrómák komorbiditását a korábban említett AK és MD kritériumok szerint állapítottuk meg. Tekintettel a génexpressziós vizsgálat metodikai követelményeire, a MD betegek és az életkor és nem szerint egyeztetett KT személyek a rúzsai Idősek Otthona lakóiból kerültek kiválasztásra.

A IIb típusú hiperlipidémiás betegeket és KT személyeket a SZTE I. sz. Belgyógyászati Klinikájának és Pszichiátriai Klinikájának járó- és bennfekvő betegei közül választottuk ki. A hiperlipidémia diagnózisának és típusának megállapítása a szérum koleszterin és triglicerid értékek meghatározása alapján történt.

Amennyiben az egyes speciális vizsgálati csoportoknál említésre nem került, az egyes vizsgálatokhoz az életkor és nem szerint egyeztetett KT személyeket a SZTE Pszichiátriai Klinika bennfekvő, valamint Memória Ambulanciájának járóbetegei és hozzátartozói közül választottuk ki. A KT személyek esetében is végeztünk belgyógyászati, neurológiai és pszichiátriai vizsgálatokat, klinikai kémiai laboratóriumi vérvizsgálatot és részletes anamnézis felvételt a belgyógyászati és neuropszichiátriai betegségek kizárása céljából.

10.1.1.1. Alzheimer-kóros és idős depressziós személyek kezelése pszichofarmakonokkal

A különböző típusú antidepresszívumokkal 4 hétig kezeltük a vizsgált személyeket az orvosi indikációknak megfelelően. A vérvételek a kezelést megelőzően és az utolsó gyógyszer bevitelének napján történtek.

10.1.2. Vizsgálati állatok

Az állatkísérletes modellekben laboratóriumi patkányok (*Rattus norvegicus*), egerek (*Mus musculus*), és nyulak (*Oryctolagus cuniculus*) beltenyésztett törzseit használtuk. A laboratóriumi állatok tenyésztését és felhasználását szabályozó 1998. évi XXVIII. tv. 32 § előírásai és az Európai Unió 86/609/EEC jogszabályai szerint jártunk el. Az állatházi körülményeket a Csongrád Megyei Állategészségügyi és Élelmiszer Ellenőrző Állomás, mint szakhatóság felügyelte. Az állatkísérletek protokollját az egyetemi Állatetikai Bizottság hagyta jóvá.

10.1.2.1. Állattetetéses kísérletek

10.1.2.1.1. Halolaj diéta patkányokban

Öt hetes hím Wistar patkányokat tartottunk szabvány patkány tápon, 4 héten keresztül, amely 10% halolajjal vagy 10% napraforgóolajjal volt kiegészítve. A halolaj zsírsav összetételét az 57. táblázat mutatja be. Az olajdús tápokot naponta frissen készítettük és peroxid-tartalmukat rendszeresen ellenőriztük. A diéták E vitamin tartalma 1.0 IU/g lipid volt.

57. táblázat A diétában használt olajok zsírsav összetétele (a teljes mennyiség %-a).

Zsírsav	Szabvány táp	Halolaj	Napraforgó olaj
14:0	1.3	6.6	-
16:0	22.4	7.1	6.0
16:1	3.1	9.9	0.7
18:0	9.1	3.3	4.9
18:1	32.6	17.3	16.3
18:2 n-6	25.7	1.2	63.2
20:1 n-9	-	4.9	-
20:4 n-6	0.4	0.7	-
20:5 n-3	-	19.7	-
22:4 n-6	-	0.8	-
22:5 n-3	-	1.9	-
22:6 n-3	-	17.3	-
Összes többi beleértve	5.4	9.3	8.9
Totál n-3	-	41.6	-
Totál n-6	26.1	2.7	63.2
n-3/n-6	-	14.4	-

10.1.2.1.2. Koleszterin diéta nyulakban

Hím, 1.5-2 kg súlyú új-zélandi nyulakat 1% koleszterol és 10% kókuszolaj tartalmú diétán tartottunk 10 héten keresztül, szabványos laboratóriumi állatházi körülmények között, önálló ketrecekben.

10.1.2.1.3. Koleszterin diéta transzgenikus egerekben

Hathetes nőstény, apoB transzgenikus és KT egereket tartottunk 17 héten keresztül szabvány tápon, illetve 2% koleszterin kiegészítéssel. Ebben a kísérletben azért csak nőstény egereket használtunk, mert az irodalmi adatok (Kim és Young 1998) szerint a nőstény egyedek esetében az ateroszklerózis mértéke nagyobb.

10.1.3. Patkányok kezelése pszichofarmakonokkal

Hím Sprague-Dawley patkányokat naponta oltottunk pszichofarmakonokkal intraperitoneálisan. A 250-300 gramm tömegű állatokat terápiás és toxikus farmakon dózisokkal, valamint vivőanyaggal (0.9% NaCl oldat) oltottuk. Az akut kísérletekben egyszeri oltást

követően 6, 12, 24, 96 óra túlélési időket alkalmaztunk a krónikus kísérletekben pedig 1, 2, 3, 4 hétig tartott a kezelés. Az állatok elaltatása után az agyakat eltávolítottuk. A hippocampuszt és a temporális agykérget felhasználva 150 mM NaCl-ot, 2 mM PMSF-et, 2 mM EDTA-t, 2 µg/ml leupeptint és 1 µg/ml pepsztatint tartalmazó 50 mM TRIS pufferben (pH 7.5) homogenizáltuk a mintákat, és -80 °C-on tároltuk a felhasználásig.

10.1.4. Agyi mikroerek tisztítása

A hal- és napraforgóolaj diétán tartott patkányok agyát a szív bal kamráján keresztül történő perfundálás (0.9%-os NaCl oldattal) után távolítottuk el. Az agyi mikroereket Hwang és mtsai (1980) módosított módszere szerint szeparáltuk. Röviden összefoglalva: az agyakat mechanikusan megtisztítottuk a piális rétegektől és a mielintől, majd az összevágott kortikális állományt teflon-üveg homogenizálóban, 9 térfogat 3 mM-os HEPES pufferben, amely 0.32 M szukrózt tartalmazott, 4 fel-le húzással homogenizáltuk. A szuszpenziót 1000 g-vel 10 percig centrifugáltuk 2 °C-on. Az üledéket 5 térfogat HEPES-szukróz pufferben 2 fel-le húzással ismételten homogenizáltuk, majd centrifugálással mostuk (1000 g, 10 perc 2 °C-on). Az üledéket kétszer mostuk HEPES-szukróz pufferben, centrifugálással (100 g, 15 s), és a két utolsó centrifugálás felülúszóját összegyűjtve ismételten centrifugáltuk azt, 200 g-vel 1 percig TC-199 szövettenyésztő médiumban (pH 7.4). Az üledék mosását hasonló módon ismételtük meg. Az agyi mikroér preparátum tisztaságáról, a sejtek életképességéről tripánkék tesztel győződünk meg fáziskontraszt mikroszkóp alatt. Csak olyan preparátumokat használtunk fel, amelyekbe a sejtek több mint 90%-a életképesnek bizonyult.

10.1.5. Agyi membrán preparátumok készítése

A koleszterin diétán tartott nyulak agyát a szív bal kamráján keresztül PBS-sel történő átmosásuk után távolítottuk el. A kortexből származó agyszövet darabokat PBS oldatban teflon-üveg homogenizátorban 10 fel-le húzással, jégen homogenizáltuk, majd 5000 g-vel 10 percig 4 °C-on centrifugálva választottuk el a törmeléktől. A felülúszót, mint durva agyi membrán preparátumot használtuk a további mérésekhez.

10.1.6. Patkány bazális előagyi neuron tenyészet készítése

A pszichofarmakonok hatásának *in vitro* vizsgálatához 18 napos patkány embrióból származó bazális előagyi neuron tenyészeteket használtunk. Az első napon (D_{IV}1) a neuron kultúrákat 37 °C-on, 5% CO₂-ot tartalmazó (95% levegő) atmoszférán tartottuk fenn 10% főtális borjú szérumot és antibiotikumokat (penicillin, sztreptomycin) tartalmazó Dulbecco's Modified Eagle Mediumban (DMEM) (Gibco), majd szérummentes környezethez adaptáltuk fokozatosan a sejteket. Az antidepresszívumokkal történő kezeléseket a 8. napon (D_{IV}8) végeztük *in vitro* az

imipramin és citalopram különböző koncentrációival (1, 10 és 100 μM – szérumban, de mesterséges szérumban helyettesítőket tartalmazó DMEM-ben) 2 órán keresztül kezeltük a tenyészeteket. A KT és kezelt kultúrák tápfolyadékait deoxikolát/triklórecetsav módszerrel precipitáltuk (Löffler és Huber 1993).

10.1.7. Humán trombociták tisztítása teljes vérből

A membrán fluiditásának vizsgálatához Menashi és mtsai (1984) módszere szerint EDTA-val alvadésgátolt vénás vérből szeparáltunk trombocitákat. A vért 200 g-vel 10 percig centrifugáltuk szobahőmérsékleten, majd a felülúszó frakciót képező trombocita-gazdag plazmát leszállítottuk, és ezzel a frakcióval megismételtük az előzőekben említett centrifugálási lépést. A maradék vért úgy távolítottuk el a trombocita-gazdag plazmából, hogy egyforma térfogatú ACD pufferrel (36 mM citromsav, 5 mM KCl, 90 mM NaCl, 5 mM glükóz, 10 mM EDTA, pH 6.8) 200 g-vel 10 percig centrifugálással mostuk. A felülúszókat összegyűjtöttük és 2000 g-vel 10 percig szobahőmérsékleten centrifugáltuk. Az üledéket – amely a trombocitákat tartalmazta – további két alkalommal mostuk 10 ml foszfát-pufferelt NaCl oldatban (PBS), amely EDTA-t is tartalmazott. A mosott trombocita szuszpenziókat 2 ml PBS-ben $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ -on tároltuk a felhasználásig. A trombocita membrán frakciót a fagyasztott minták $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ -ra való kiolvasztásával készítettünk, háromszori, PBS-ben történő mosás során (25 000 g, 20 perc, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$).

10.1.8. Limfociták tisztítása vérből

A perifériás mononukleáris sejteket Ficoll 400 vagy Histopaque 1077 (Sigma, Németország) oldatra rétegzett, EDTA-val alvadésgátolt friss vénás vérből, gradiens centrifugálással tisztítottunk (200 g, 15 perc, szobahőmérséklet). A fázisrétegek határán elhelyezkedő limfocita gyűrűt pipettával távolítottuk el és a sejteket kétszer mostuk PBS-ben (200 g, 5 perc). Egy milliliter vérből átlagosan 10^6 sejtet nyertünk.

10.1.9. Genomikai módszerek

10.1.9.1. ApoB-100 transzgenikus egerek előállítása

Az ApoB-100 transzgenikus egerek tenyésztését nőstény, C57B6 x CBA F1 egerekből nyert megtermékenyített petesejtekkel kezdtük. A petesejtekbe tisztított P1 fág DNS-t injektáltunk 1 ng/ml koncentrációban, amely tartalmazta a 43 kb hosszú teljes humán ApoB-100 gén szekvenciát, továbbá a 19 kb 5' és 14 kb hosszú 3' szomszédos genomikus szekvenciákat, melyeket Professzor E. Rubintól kaptunk (University of California, CA, USA). A mikroinjektált petesejtek visszaültetése után született transzgenikus F1 generációt és a KT állatokat is kétszer kereszteztük vissza az eredeti C57B6 törzsszel. Csak homozigóta ApoB-100 transzgenikus egereket használtunk fel kísérleteinkben. A transzgént legjobban expresszáló tenyésztési vonalat

az állatok farok szövetharabjából tisztított DNS minta RT-PCR vizsgálatával választottuk ki. A PCR primer szekvenciák az ApoB-100 gén 5' promoter szakaszáról készültek (Callow és mtsai 1994).

10.1.9.2. Biglikán transzgenikus egerek előállítása

Az expresszióra előkészített biglikán klónt az Invitrogen-től vásároltuk meg. A klón a teljes humán biglikán cDNS-t tartalmazta Citomegalo vírus promoterhez kapcsolva, továbbá egy V5 epitópot és egy 6X His Tag szekvenciát a cDNS 3' végén. Egy 3440 bp nagyságú fragment - amely a transzkripció egységet is tartalmazta - eltávolítása után 2 ng/μl cDNS-t juttattunk mikroinjekciós technika segítségével C57BX6CBA egerek megtermékenyített petesejtjeibe. A transzgént hordozókat farokmintából tisztított DNS-ből, PCR vizsgálattal és dot-blot módszerrel azonosítottuk a következő primerek használatával: forward primer 5' -GGA CTC TGT CAC ACC CAC CT- 3', reverse primer: 5'-AGC TCG GAG ATG TCG TTG TT- 3'. A dot-blot hibridizációhoz egy 824 bp hosszú Nru I - Hind III fragmenst jelöltünk ³²P izotóppal és 5 μg genomikus DNS-el hibridizáltattuk. A különböző szövetek (agy, máj, szív, izom) transzgén kifejeződését RT-PCR segítségével határoztuk meg, és a biglikán mRNS-t legnagyobb mennyiségben expresszáló tenyésztési vonalat választottuk ki. Homozigóta apoB-100-as és biglikán homozigóta transzgenikus állatokat keresztezve heterozigóta, kettős transzgenikus egereket (apoB^{+/-} x biglikán ^{+/-}) hoztunk létre, és használtunk fel kísérleteinkhez. A transzgenikus egerek agyából Western blot módszerrel mutattuk ki a biglikán expresszióját. A biglikán immunoblot kísérletekhez az elsődleges ellenanyagot nyulakban állítottuk elő immunizációval.

10.1.9.3. Gén polimorfizmus vizsgálatok

10.1.9.3.1. Vérminták vétele, limfociták tisztítása és a DNS kivonása

Négy milliliter EDTA-val alvadésgátolt vénás vért vettünk a vizsgálati személyektől és -80 °C-on tároltuk a mintákat felhasználásukig. A teljes vérmintákból standard fenol-kloroform extrakciós technikával preparáltunk DNS-t.

Más esetekben perifériás vérből preparáltunk leukocitákat vénás vért rétegezve Histopaque 1077-re. A mintákat 15 percig 200 g-vel centrifugáltuk 4°C-on. A felső réteget, amely a limfocitákat tartalmazta, eltávolítottuk és foszfát-pufferrel (pH 7.2) centrifugálással (200 g, 3 perc) kétszer mostuk a sejteket. A mosott sejtszuszpenzióból történt a DNS kivonása ezt követően (Davies 1986).

10.1.9.3.2. ApoE polimorfizmus

Az apoE allél meghatározást Crook és mtsai (1994) leírása szerint végeztük PCR módszerrel. A primerek nukleotid sorrendje a következő volt:

5'-TCCAAGGAGCTGCAGGCGGCGCA-3',

5'-ACAGAATTCGCCCCGGCCTGGTACACTGCCA-3'.

A PCR reakcióelegy 20-400 ng genomikus DNS-t, 1.25 µl-t a 20 mM-os dATP, dGTP, dCTP, dTTP nukleotidok keverékéből, egyenként 1.25 µl 20 µM-os primert, 2.5 µl 5% DMSO-t, 0.5 E *Taq* DNS-polimerázt, 1.5 µl 25 mM MgCl₂-t tartalmazott 67 mM TRIS-HCl pufferben (pH 8.8). A végtérfogat 25 µl volt. Öt perces 95 °C-os denaturáció után, 30 darab 30 másodperces 94 °C-os, 22 másodperces 63 °C-os és 30 másodperces 72 °C-os ciklus következett, amelyet 3 perces 72°C-os extenzió zárt le. A PCR reakciót PTC 100, Thermal Controller MJ Res. Inc. készülékkel végeztük. Az amplifikáció után 5 egység *Cfo*I (Promega) enzimet adtunk a PCR reakcióelegyhez, és 37°C-on inkubáltuk a mintákat egy éjszakán keresztül. A termékeket 8%-os poliakrilamid/bis-akrilamid gélen szeparáltuk és etídium-bromidral tettük láthatóvá.

10.1.9.3.3. ApoE -491 A/T promoter polimorfizmus

Az apoE promoter szakaszának -491A/T polimorfizmus-vizsgálatát Wang és mtsai (2000) leírása szerint végeztük. A primerek nukleotid sorrendje a következő volt;

forward primer 5'-CAA GGT CAC ACA GCT GGC AAC'; reverse primer 5'-TCC AAT CGA CGG CTA GCT ACC-3'. A PCR termékeket *Dra*I restrikciós enzimmel hasítottuk, majd 8% poliakrilamid/bis-akrilamid gélen választottuk el.

10.1.9.3.4. CYP46 T/C polimorfizmus

A CYP46 C/T polimorfizmust Borroni és mtsai (2004) által leírt módszer szerint vizsgáltuk. A forward primer: 5'-TGA AAA CGA GTT TCC CGT CC-3'; a reverze primer pedig: 5'-GTG TGA CCA GGT AAC AGT CA-3' volt.

95 °C volt a kezdő denaturációs hőmérséklet 5 percig, amelyet 32 cikluson keresztül: 30 s-os denaturáció 95 °C-on, annealing 30 s-ig 53 °C-on, rövid, 30 s-os extenziós időszak 72 °C-on követett, és végül, egy hosszabb, tíz perces extenziós szakasz zárt le 72 °C-on. A PCR termékeket *Msp*I restrikciós enzim segítségével hasítottuk. A fragmensek közül a 209 bp és 76 bp hosszúak feleltek meg a C allélnak, míg az el nem hasított 285 bp nagyságú terméket T allélnak tekintettük.

10.1.9.3.5. A BChE-K polimorfizmus

A BChE-K allél polimorfizmusát Wiebusch és mtsai (1999) módszere szerint vizsgáltuk, módosításokkal. 500 ng genomikus DNS mintához 5 pmol háromféle primert (általános, K-allél specifikus és vad-típus) adtunk. Felsorolási sorrendben:

5'-CTGTACTGTGTAGTTAGAGAAAATGGC-3';

5' ATGGAATCCTGCTTTCCACTCCCATTCCGT-3;

5' ATCATGTAATTGTTCCAGCGTAGGAATCCTGCTTTCCACTCCCATTCTCC-3' volt a primerek szekvenciája. 95 °C (2 perc) volt a kezdő denaturációs hőmérséklet, melyet 40 cikluson keresztül: 30 s-os denaturáció 95 °C-on, annealing 45 s-ig 60 °C-on, rövid, 45 s-os extenziós időszak követett 72 °C-on, és végül, egy hosszabb, három perces extenziós szakasz zárt le 72 °C-on. 4%-os agaróz gélen választottuk szét a keletkezett PCR termékeket és etídium-bromidos festéssel, UV fény alatt azonosítottuk a genotípusokat. Egy 169 bp hosszú termék felelt meg a vad típusnak, a 149 bp hosszú pedig a K-allélnak. A két termék együttes jelenlétét heterozigóta állapotnak tekintettük.

58. táblázat Az RT-PCR és a QRT-PCR kísérletek primerei.

Az RT-PCR célmolekulái	Forward primer	Reverse primer	Méret (bázispár)	Irodalom
APP695	5'-ACTAACTTGCACGAC TATGGCATGCTGCTGCC CTG-3', 500-537 bp	5'-GCTGGCTGCCGTCGTGG GAACTCGGACTACCTCCT CCAC A-3', 861-901 bp	242	Kang és mtsai 1987 Shivers és mtsai 1988 Sola és mtsai 1993
APP770	5'-CTACCACTGAGTCT GTGGAG-3', 848-868 bp	5'-CTTGAGTAAACTTTGGG ATGACACGCTGCCACACAC CGCC-3', 1028-1068 bp	401	
β-aktin	5'-GTGGGCCGCTCTA GGCACAA-3', 25-45 bp	5'-CTCTTTGATGTCACGCA CGATTTC-3', 564-540 bp	537	
Az RT-PCR célmolekulái	Forward primer	Reverse primer	Munkacsoportunk tervezte	
apoB-100	5'-CAAGAGGTATTTAAA GCCATT-3'	5'-CGTAGCACCTCTGTGGT CTTG-3'		
β-aktin	5'-CAGCAGATGTGGATC AGCA-3'	5'-CTTGCGGTGCACGATGG- 3'		

10.1.9.4. Az APP mRNS szintek meghatározása agymintákban

Az APP mRNS-ének mennyiségét RT-PCR segítségével határoztuk meg. Az agyi kortex mintákból a teljes sejt RNS-t guanidinium tiocianát fenol-kloroform módszerrel vontuk ki (Chomczynski és Sacchi 1987) Öt µg mRNS cDNS-sé való visszaírása oligo (dt)₁₈ primerek (RevertAid™ First Strand cDNS Synthesis Kit (Fermentas) segítségével történt. A keletkezett cDNS-t PCR módszerrel sokszoroztuk meg. A β-aktin, APP770 és APP695 (539, 401 és 242 bázispár PCR termékek) primerek szekvenciáját az 57. táblázat foglalja össze. A PCR reakciót My Cyclyer™ Thermal Cyclyer (BioRad, CA, USA) PCR géppel végeztük 25 µl végtérfogatban, amely 2.5 µl 10x PCR puffert, 2 µl 25 mM MgCl₂-ot, 4 µl 5 mM dNTP keveréket és 3 pmol specifikus primert tartalmazott β-aktin-ra és APP695-re, valamint 10 pmol primert APP770-re vonatkozóan, továbbá 2 µl templát cDNS-t és 0.25 µl Taq DNS polimeráz enzimet (5

egység/ μ l). A 30 db PCR ciklus a következőképpen zajlott: denaturáció (30 s, 95 °C), annealing (30 s, 55 °C) extenzió (1 perc, 72 °C). A szintetizált termékeket elektroforézissel választottuk szét 1.3%-os agaróz gélen. Az APP695/ β -aktin és APP770/ β -aktin mRNS hányadosokat kiszámítottuk.

10.1.9.5. Gén expressziós profil vizsgálatok DNS chip módszerrel

Az oltott állatok kortexéből és humán limfocita preparátumokból teljes RNS-t tisztítottunk a NucleoSpin RNS izolációs kit segítségével (Macherey-Nagel, Dürren, Germany). A tisztított RNS mennyiségét és minőségét spektrofotometriásan és gélelektroforézis segítségével ellenőriztük. A DNS mintákat az egyes kísérletekben leírtak szerint, csoportokba vontuk össze. A tisztított teljes RNS-t használtuk fel a mikrochip technikához és a QRT-PCR-hez.

A mikrochipek elkészítése és használata Kitajka és mtsai (2002) és Puskás és mtsai (2002) módszerei alapján történt. A mikrochip próbák a lineáris felsokszorozási technika módosított módszerével készültek (Puskás és mtsai 2002).

Röviden összefoglalva: a humán chipek esetében 3200 vagy 9000 cDNS inszertumot választottunk ki humán cDNS könyvtárakból, melyek agyi, perifériás ganglion, szív és kevert szöveti génszekvenciákat tartalmaztak. A kérdéses szekvenciákat MultiScreen-PCR lapokon (Millipore, Bedford MA, USA) amplifikáltuk fel és 50%-os dimetilszulfoxid/víz oldatban feloldva amino-szilanzált üveglapkákra vittünk fel MicroGrid Total Array System robotok segítségével DNS duplikátumok formájában 16 tűvel, 4x4-es formátumban. Minden egyes génnyomtatvány feltárási mérete 200 μ m volt. A nyomtatás után 700 mJ UV fénnel hoztunk létre keresztkötéseket a DNS szálak és az üveglap felszíne között (Stratalinker, La Jolla, CA, USA). Ezt követően SDC-ben (0.2%-os Na-dodecilszulfát (SDS) oldatban feloldott 1%-os borjú szérum albumin) blokkoltuk az üveglemezeket 30 percig 42 °C-on, majd vizes mosás után szárítottuk.

A csoportok szerint összevont teljes RNS mintákat Cy3 és Cy5 fluoreszcens festékkel jelöltük a reverz transzkripció során, melyet H(-) pont-mutáns M-MLV reverz transzkriptázzal végeztünk (Fermentas, Vilnius, Litvánia) random heptamerek hozzáadásával. A reverz transzkripciót követően a mintákat alkalikusan hidrolizáltuk, és a jelölt cDNS-t NucleoSpinTM PCR (Macherey-Nagel) segítségével tisztítottuk. A KT és kezelt állatok agyából készített mintákat hibridizációs pufferben (50% formamid, 5xSSC, 0.1% SDS, 100 μ g/ml lazac sperma DNS) vittük fel a mikrochipre 5 perces, 85 °C-on elvégzett denaturáció után. Az üveglemezt fedőlemezzel borítottuk le a párolgás megelőzése céljából, melyet ragasztóval rögzítettünk. A lemezeket 18 órán keresztül inkubáltuk 42 °C-on, hibridizációs kamrában. A hibridizációt

követően a fedőlemezt és a ragasztót eltávolítottuk, és mártogatással mostuk a lemezeket 10 percen keresztül először SSC oldatban, amely 0.1% SDS-t tartalmazott, majd 0.1x SSC és 0.1% SDS-t oldatban és ezt követően 0.1x SSC-t tartalmazó oldatban szobahőmérsékleten. Ezt követően megszárítottuk a lemezeket.

Minden kísérletet kétszer végeztünk a téves pozitív és negatív eredmények arányának csökkentése céljából. Minden egyes csoportonként összevont RNS mintából kétfajta, egy Cy5 és egy Cy3 jelölt mintát készítettünk a színváltásos kísérlet céljából (Eisen és mtsai 1998).

10.1.9.5.1. Mérés és adatelemzés

A chipet zöld (543 nm) és vörös (642 nm) lézer fény alatt vizsgáltuk ScanArray Lite (GSI Lumonics, Billerica, MA, USA) leolvasóval, amely 10 μ m konfokális fluoreszcens leolvasó fejjel volt felszerelve. A képanalízist GenePix Pro 3.0 számítógépes program (Axon Instruments Inc., Foster City, CA, USA) segítségével végeztük. Minden foltot automata pozicionáló állított be a lemezen. A pixel intenzitások átlagát és mediánját az egyéni hátterek figyelembe vételével számítottuk ki mindkét csatorna esetében. Az átlagos expressziós hányadost minden gén esetében 1.0-hoz normalizáltuk. A háttér korrekciós számításokhoz az adatokat negatívként kezeltük, és a fluoreszcens intenzitási pixelek százalékában adtuk meg a háttér intenzitást is figyelembe véve ($\% > B649 + 2 \text{ SD}$ és $\% > B550 + 2 \text{ SD}$) mindkét csatorna esetében. A mérések és kísérletek kétszeri ismétlése összesen 4 adatpontot adott minden egyes gén esetében. Azoknak a pontoknak az adatait nem vettük figyelembe az értékeléskor a továbbiakban, amelyeknél az ismételt kísérletek eredményei között 1.85 x-nél nagyobb különbséget találtunk. Az ismételt kísérletek esetében ugyanezeket a kritériumokat alkalmaztuk a regulált gének expressziós változásainak meghatározásához.

10.1.9.5.2. QRT-PCR

A DNS mikrochip eredmények megerősítése céljából a QRT-PCR-t Rotor Gene 2000 géppel végeztük (Corbett Research, Sydney, Ausztrália). 2-5 μ g teljes RNS-ből kiindulva minden egyes mintából reverz transzkripciót végeztünk poli(dT) szekvenciák jelenlétében 20 μ l végtérfogatban. Ebből a keverékből, amely a keletkező cDNS-t is tartalmazta, 1 μ l-t használtunk fel templátként a QRT-PCR-hez. A PCR reakciót 20 μ l végtérfogatban, amely 2 μ l-t tartalmazott mind a forward, mind a reverz primerekből, 1x BioRad SybrGreen pufferban (BioRad, Magyarország), a következő protokoll szerint végeztük: 10 perc denaturáció 95 °C-on, 45 ciklus 25 másodperces denaturáció 94 °C-on, 25 s annealing 59 °C-on és 25 s extenzió 72 °C-on. A fluoreszcens jeleket minden egyes extenziós lépés után mérte az automata 72 °C-os hőmérsékleten. Az adatokat korrekciós módszereket is figyelembe véve számítógép elemezte az alapvonalhoz közeli adatok kizárásával. A relatív expressziós hányadosokat β -aktin

expressziójához viszonyítottuk standardként. Minden PCR kísérletet négyszer ismételtünk meg.

10.1.9.6. Comet vizsgálatok

10.1.9.6.1. A vizsgálat elméleti alapjai

A comet vizsgálat, vagy másnéven „egy-sejt gélelektroforézis”, a genomikus károsodás mértékének felmérésére alkalmas módszer, amellyel az egyes szálú DNS töréseket, az ún. lág-labilis helyeket, és a DNS-DNS valamint DNS-protein keresztkötéseket vizsgálhatjuk.

A reaktív oxigén gyökök által okozott nukleinsav károsodás bázis-módosulásokat is eredményezhet a DNS lánc egyik, vagy akár mindkét szálának törése mellett, ha azok közel helyezkednek el egymáshoz. Az alkalikus comet vizsgálat kombinációs alkalmazása két, károsodás specifikus endonukleáz enzim, endonukleáz III (Endo III) és formamidopirimidin DNS-glikoziláz (Fpg) emésztéssel, amely a DNS molekula oxidatív károsodásának minőségi sajátosságairól adhat információt, mivel ezek az enzimek az oxidált pirimidin és purin bázisok felismerésére, kihasítására képesek és e károsodott helyeket egyes szálú törésekké alakítják. A kialakuló DNS szál töredékek a comet vizsgálat elektroforézise során az anód felé vándorolnak. Ezek az elektroforetikusán vándorló DNS szálak képezik az üstökös csóvját („farkát”). Minél több a károsodás a DNS-ben, annál nagyobb lesz az üstökös csóvjája.

10.1.9.6.2. A comet vizsgálat

A szeparált perifériás limfocitákat három részre osztottuk. Egyharmadukat nem kezeltük és az alapszintű, spontán DNS károsodás meghatározásához használtuk fel. A többit 100 μ M PBS-ben hígított H_2O_2 -al kezeltük 5 percig jégen, így indukálva az oxidatív DNS károsodást, mely jellemzi a sejtek antioxidáns kapacitását is. A kezelést követően háromszor mostuk a sejteket PBS-ben, majd a sejtmennyiség felét 1 ml RPMI 1640 tápfolyadékban szuszpendáltuk fel (Gibco, Skócia), amely 2 mM L-glutamint és antibiotikumokat tartalmazott. A sejtszuspenziót 1 óráig inkubáltuk 37 °C-on 5% CO_2 jelenlétében azzal a céllal, hogy a DNS repair folyamatok végbemenjenek.

Az alkalikus comet vizsgálatot Collins és mtsai (1996), valamint a korábban leírt módszerünk Mórocz és mtsai (2002) szerint végeztük, kisebb módosításokkal. Normál olvadáspontú, 1%-os agarózzal felületkezelt mikroszkóp tárgylemezeket 4 °C-on tároltuk felhasználásukig. A korábban említettek szerint kezelt limfocita szuszpenziókat (minimum 10 ezer sejt lemezenként) 70 μ l 0.75%-os, alacsony olvadáspontú agaróz oldatban kevertük el, és a már korábban agarózzal felületkezelt mikroszkóp tárgylemezekre cseppentettük, majd fedőlemezzel fedtük le. Az új agarózzréteget 5 percig 4 °C-on hagytuk megdermedni. Miután megdermedt, a fedőlemezeket eltávolítottuk a tárgylemezekről, és a sejtek fehérjetartalmának

eltávolítása céljából egy órán keresztül hideg lízis pufferben (2.5 M NaCl, 0.1 M Na₂EDTA, 1% Triton X-100 (frissen hozzáadva), 10 mM TRIS, pH 10) kezeltük őket. Ez a lízis pufferes kezelés a sejtmagokat mintegy feltárta, elérhetővé tette az endonukleáz kezelés számára.

A tárgylemezek lízis pufferből történő eltávolítása után háromszor mostuk a mintákat 5 percig enzim pufferben (40 mM HEPES, 0.1 KCl, 0.5 mM EDTA, 0.2 mg/ml borjú szérum albumin, pH 8). Ezt követően, 50 µl enzim puffert (a kontroll lemezekre), vagy 10 ezres hígítású EndoIII (Biolabs, New England), vagy 3 ezres hígítású Fpg (Biolabs, New England) oldatot cseppentettünk a tárgylemezekre, és fedőlemezzel ismételten lefedve, nedveskamrában 37 °C-on 45 percig inkubáltuk a mintákat.

Az inkubációs idő leteltével a fedőlemezeket eltávolítottuk és frissen készített, hideg elektroforézis pufferbe helyeztük a tárgylemezeket. Húsz perces inkubálás után (a törött DNS szálak denaturálódása céljából) a DNS töredékeket vízszintes elektroforézissel választottuk el (20 percig, 25 V-os feszültség mellett, 300 mA-es áramerősséggel). Ezt követően neutralizáló pufferrel mostuk a lemezeket, és etídium-bromiddal festettük.

A minták vizsgálata digitális kamerával felszerelt fluoreszcens mikroszkóppal (Axioskop 2 MOT, Zeiss) történt. Száz, véletlenszerűen kiválasztott sejtet vizsgáltunk a Comet 5.0 képanalizáló számítógépes program segítségével (Kinetic Imaging Ltd. Liverpool, Egyesült Királyság) és a DNS mennyiségét a comet csóvában, a „DNS farok %”-ban adtuk meg. Mivel az enzimes kezelések száltöréseket indukáltak, az enzim-kezelt lemezek esetében kapott „DNS farok %”-értékek az enzimek nélkül detektálható egyes szálú töréseket, és az adott enzim által felismert (és ott száltörést okozott), oxidatív károsodott bázis-típus (purin vagy pirimidin) mennyiségét is magukban foglalják. A „javított” károsodások számát pedig úgy kaptuk meg, hogy az oxidatív stressz-indukált törések számából kivontuk a megmaradt törések számát.

10.1.9.7. Ultraibolya B sugárzás-kiváltott apoptózis vizsgálata limfocitákon

A vénás vérből tisztított perifériás mononukleáris sejteket (10⁶ sejtet mérési pontonként) 308 nm-es hullámhosszon, XeCl ultraibolya UVB lézer fény (Photomedex Incorporation, USA) segítségével sugároztuk be, 100, 200 és 300 mJ/cm² expozíciós dózisokat alkalmazva. A besugárzást követően RPMI 1640 tápfolyadékban szuszpendáltuk fel a sejteket, amely 10% AB vércsoport pozitív, hő-inaktivált humán szérummal, 2 mM L-glutammal és antibiotikumokkal volt kiegészítve, és 5%-os CO₂ közegben, 37 °C-on, 20 órán keresztül tartottuk a tenyészeteket termosztátban.

10.1.9.8. Áramlásos citofluorimetriás mérések

Az UVB fénnel besugárzott limfocitákat humán-CD3 ellenes FITC-jelölt monoklonális ellenanyaggal jelöltük (Dako, Dánia), majd 2%-os paraformaldehiddel fixáltuk, és

membránjaikat 0.01%-os szaponin oldattal permeabilizáltuk, amely 1% borjú savót és 0.02% Na-azidot tartalmazott. Ezután Apo2.7-PE monoklonális ellenanyaggal jelöltük a sejteket (Immunotech, Franciaország). Az ál-pozitív reakciók kivédése céljából a KT minták esetében izotípus szerint egyeztetett IgG₁-PE monoklonális ellenanyag jelölést is alkalmaztunk. A flow citometriás méréseket FACStar Plus (Becton Dickinson, USA) flow citométerrel végeztük, az eredményeket pedig CellQuest számítógépes program segítségével számítottuk ki (Becton Dickinson, USA). Mintánként legalább tízezer sejtet mértünk le. A vizsgálatban az Apo2.7-PE és a CD3-FITC pozitív festődésű polimorfonukleális sejtek számát viszonyítottuk az összes CD3 pozitív T-limfocita számához.

10.1.10. Biokémiai és immunhisztokémiai módszerek

10.1.10.1. APP és PKC szemikvantitatív meghatározása Western immunoblottal

A transzgenikus egerek és a pszichofarmakon oltott patkányok máj- és agymintáit teflon-üveg homogenizátorban homogenizáltuk proteáz gátlókkal kiegészített TRIS pufferben. Az agyminták esetében a homogenátumokat 100 000 g-vel 30 percig 4 °C-on centrifugáltuk. A keletkezett felülúszó frakciót „szolubilis” frakciónak kezeltük a továbbiakban. A szolubilis és membrán kötött frakciók megkülönböztetésének az APP és PKC immunoblot eredmények értékelése szempontjából van jelentősége. Az üledéket 1% SDS-t és proteáz gátlókat tartalmazó TRIS pufferben szuszpendáltuk fel újra és az előző centrifugálási lépést megismételve mostuk. A keletkezett felülúszó frakciót „membrán” frakciónak tekintettük a további immunoblot kísérletekben.

Az agyi BACE tartalom mérése során nem különítettünk el szolubilis és membrán kötött frakciókat. A minták fehérje tartalmát Lowry és mtsai (1951) módszere szerint határoztuk meg. A 25 µg fehérje tartalmú mintákat 9%-os poliakrilamid gélen futtattuk, a szétválasztott fehérjéket pedig nitrocellulóz membránra transzferáltuk. A membránokat APP ellen termelt monoklonális antitesttel (22C11, Boehringer Mannheim, Németország) inkubáltuk egy éjszakán keresztül. Az APP vizsgálatok esetében a másodlagos antitest (HRP jelölt egér ellenes birka IgG, Sigma, USA) volt, amellyel egy órán át inkubáltunk. A PKC ellenanyag szintén monoklonális volt, a BACE esetében pedig poliklonális ellenanyagot használtunk. Ez utóbbinál HRP jelölt nyúl ellenes kecske IgG került felhasználásra. A munkafázisok közötti mosások 0.2% Tween-20-at tartalmazó 0.1 M TRIS puffer - 0.9% NaCl-ban történtek, rázógéppel, 5x5 percig. Az immunoblot reakciót Supersignal West Pico kemilumineszcens reagensben (Pierce, USA) történt 5 perces inkubációval és 1 perces röntgenfilmre történő hívással tettük láthatóvá. A csíkokat denzitometriával kvantifikáltuk.

10.1.10.2. Elektroforetikus mobilitási shift vizsgálatok (EMSA)

10.1.10.2.1. A nukleális fehérje kivonat készítése

A koleszterin diétán tartott nyulak agyából a nukleális fehérje preparátumot Yan és mtsai (1995) módszerével készítettük. Az agymintákat 7.9-es pH-jú HEPES oldatban – amely 1.5 mM MgCl₂, 10 mM KCl, 10% glicerol, 1 mM DTT és 0.5 PMSF-et tartalmazott – teflon-üveg homogenizátorral homogenizáltuk 10 fel-le húzással és 15 percig jégen inkubáltuk. 3ml 10%-os NP-40-et adtunk a szuszpenzióhoz és röviden vortexeltük. A sejtmagokat centrifugálással választottuk el (4000 g, 5 perc, 4 °C-on). A nukleuszokat tartalmazó üledéket 70 µl puffer D-ben szuszpendáltuk (20 mM HEPES, pH 7.9, 400 mM NaCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM EDTA, 20% glicerol, 1 mM DTT, 0.5 mM MPMSF). A szuszpenziót 4 °C-on 20 percig inkubáltuk, majd 8000 g-val 5 percig centrifugáltuk. A felülúszó tartalmazta a nukleális protein preparátumot, amelynek fehérje tartalmát Detergent Compatible Protein Assay Kit segítségével határoztuk meg (BioRad, USA). Borjú szérum albumint használtunk standardként.

10.1.10.2.2. EMSA

Az EMSA vizsgálatokban az NF-κB molekula DNS kötő szekvenciáját tartalmazó kettős szálú oligonukleotidot használtunk a transzkripciós faktor DNS kötő képességének mérésére. A használt szekvenciája a következő volt: -AGT TGA GGG GAC TTT CCC AGG C-3'-(Santa Cruz Biotechnology, CA, USA). Az aláhúzás az NF-κB-t kötő szekvenciát jelöli. Az EMSA mérést Andrews és mtsai (1991) módszere szerint végeztük. Röviden: 50 ng kettős szálú NF-κB-kötő oligonukleotidot [γ-³²P]-ATP (NEN) jelöltünk a végein T4 polinukleotid kináz segítségével, és a jelölt próbákat etanol kicsapással tisztítottuk meg. A DNS kötési reakcióhoz használt oldat a következőket tartalmazta: 10 µg nukleáris protein kivonat, 10 mM TRIS (pH 7.6), 60 mM NaCl, 1 mM DTT, 4 mM MgCl₂, 1 mM EDTA, 6 fmol ³²P-jelölt oligonukleotid (kb. 20 000 cpm-nek megfelelő érték) és 5% glicerol 20 µl végtérfogatban. A reakcióelegyet nem-jelölt oligonukleotidok hozzáadásával, és anélkül is, 20 percig 37 °C-on inkubáltuk. A mintákat 4%-os natív poliakrilamid gélen elektroforézissel választottuk el. Az izotóp-kötéssel jelölt fehérjéket a szárítás után autoradiográfiával tettük láthatóvá a géleken. A jelölés erősségét lézer denzitometriával kvantifikáltuk és relatív arányokat számítottunk, amelyeket relatív egységekben fejeztünk ki.

Az AP-1-et kötő kettős szálú oligonukleotid szekvenciája a következő volt: 5'-CGCTTGATGACTCAGCCGAA-3' (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA). A transzkripciós faktor-kötő szekvenciát ebben az esetben is aláhúzással jelöltem. Az EMSA méréseket az NF-

κ B-EMSA mérési módszeréhez hasonlóan végeztük az AP-1 esetében.

10.1.10.3. Az AChE és BChE enzimek aktivitásának meghatározása

AChE és BChE aktivitás meghatározását Ellman és mtsai (1961) spektrofotometriás módszerével határoztuk meg. Szubsztrátként acetiltiokolint vagy butiriltiokolint használtunk. Az AChE-t specifikus BChE inhibitor (ethopropazin 10^{-4} M), a BChE-t pedig specifikus AChE inhibitor jelenlétében (1,5 bis(allildimetilammoniumfenil)pentán 3-dibromid, BW284c51, 10^{-5} M) mértük.

10.1.10.3.1. Az AChE enzim molekuláris formáinak szétválasztása

A mosott vvt membránokat és trombocitákat 0.5% Triton-X-100-t és 0.4 M NaCl-ot tartalmazó, 12.5 mM-os nátrium-foszfát pufferben (pH 7.2) homogenizáltuk, és az enzim molekuláris formáit 5-20%-os szukróz grádiensen, ultracentrifugálással különítettük el (Rakonczay és mtsai 1981). A plazma mintákat közvetlenül rétegeztünk a grádiensre. Az ultracentrifugálás SW-65 rotorral, 60 000 rpm-en történt 8 órán keresztül 4 °C-on. Szedimentációs markerként borjú szérum albumint, β -galatozidáz és kataláz enzimeket és FITC jelölt IgG-t használtunk.

10.1.10.4. A vérplazma és az agyi membrán preparátumok malondialdehid tartalmának mérése

A humán vérplazma, valamint a koleszterin diétán tartott nyulak vérplazmájának és agyi membrán preparátumainak tiobarbiturátsav reaktív anyagait, malondialdehid szintjeit a -80 °C-ra fagyasztott mintákból tiobarbiturátsavas meghatározással Placer és mtsai (1966), valamint Buege és Aust (1978) módszere szerint végeztük. Az egyes minták tiobarbiturátsav reaktív anyag szintjeit kalibrációs görbe malondialdehid ekvivalens értékeihez hasonlítottuk, melyet 1,1,3,3-tetraetoxipropán-savas hidrolízise révén határoztunk meg.

10.1.10.5. ApoD kimutatása Western immunoblottal

Az AK és KT személyek mediális temporális lebenyéből származó agyminta darabokat -80 °C-on tároltuk. A kortikális szürkeállományt mechanikusan választottuk szét, megtisztítottuk az erektől, agyhártya daraboktól és a fehérállománytól. A cortex darabokat 10 másodperces szonikálással szolubilizáltuk 1%-os SDS-ben, amelyet PBS-ben oldottunk fel, majd a mintákat vízfürdőben forraltuk 5 percig.

Az immunoblot kísérletben 10 μ g fehérjét vittünk fel 12%-os SDS-poliakrilamid gélre, emlő ciszta folyadékból tisztított apoD-t használva belső standardként. Az elektroforetikusan szétválasztott fehérjéket nitrocellulóz membránra transzferáltuk. 5%-os zsírtalanított tejben történő blokkolás után biotin-jelölt humán apoD ellenanyaggal inkubáltuk a membránt

(McConathy és Alaupovic 1986) 1000x hígításban szobahőmérsékleten 1 óráig. Ismételt mosásokat követően sztreptavidin alkalikus foszfatáz-konjugált másodlagos ellenanyaggal 2000x hígításban inkubáltuk a membránokat további 1 óráig. Az elsődleges és másodlagos ellenanyagokat TRIS-pufferelt NaCl oldatban inkubáltuk a membránnal, amely a mosások esetében 0.05% Tween 20-at is tartalmazott. A fehérjéket BCIP/NBT foszfatáz szubsztrát kittel jelöltük (Kirkegaard & Perry Laboratories, Gaithersburg, MD, USA). A blottokat lézer denzitométerrel értékeltük. Az egyes csíkok festődését önkényes relatív egységekben adtuk meg.

10.1.10.6. Az ApoD immunhisztokémia humán agymintákból

Az 5 mm vastag agyszövet darabokat 4%-os paraformaldehid-foszfat puffer oldatban fixáltuk két napig. A paraffinba ágyazás után 7 µm vastag metszeteket készítettünk a mintákból, amelyeket polilizin kezelt tárgylemezekre szárítottunk. Deparaffinizálás után 1% kecskesavóval blokkoltuk a nem specifikus kötőhelyeket szobahőmérsékleten, 1 órán keresztül. Ezt követően humán apoD ellenes poliklonális kecske antiszérum (1:200) inkubálás következett, 1 órán keresztül, szobahőmérsékleten, nedveskamrában. Háromszori mosás után, polivalens sztreptavidin alkalikus foszfatáz-konjugált másodlagos ellenanyag jelölés következett, 200x hígításban, 1 órán keresztül, PBS oldatban. A színreakciót Liquid Fast Red Chromogen Kit (Cell Marque, Austin TX, USA) segítségével hoztuk létre. Az immunhisztokémiai festést követően a metszeteket hematoxin-eozin festékkel is festettük. Az agyminták immunhisztokémiai festésével párhuzamosan humán emlőszövetet és véralvadéket is festettünk apoD-re pozitív kontrollként hasonló módszerekkel. Az agyminták esetében, párhuzamos mintákból immunhisztokémiai festések történtek egér monoklonális GFAP ellenanyaggal 100x-os hígításban (Cell Marque, Austin TX, USA). A Bielschowsky-festést pedig a SzP-ok és a NFF-ok közös jelölésére alkalmaztuk.

10.1.10.7. A vérplazma és a vvt-k KAT aktivitásnak meghatározása

A KAT méréseket Mason (1954) módszerének módosításával végeztük (Hartai és mtsai 2005). Az eredményeket hemoglobin tartalomra vagy teljes plazma fehérjére számítva, a vvt-k esetében pmol/mg Hb/óra, a vérplazma esetében pedig pmol/mg fehérje/óra értékekben fejeztük ki.

10.1.10.8. A vérplazma és a vvt-k KIN és KINA tartalmának meghatározása

A vérplazma és a vvt-k KIN és KINA szintjeit Wu és mtsai (2000) módszere szerint mértük. Röviden összefoglalva, a mosott vvt-eket desztillált vízzel (1:1 arányban) összekeverve hemolizáltuk, majd 3500 fordulat/perc sebességgel 15 percig centrifugáltuk 24 °C-on. 800 µl üledékekhez 3.2 ml acetonitrilt adtunk a fehérjék kicsapása céljából. A csapadékot 3500 fordulat/perc sebességgel 10 perces centrifugálással ülepítettük. A felülúszót 50 °C-os

termosztátba helyezve nitrogén gázáram alatt koncentráltuk. Ezt követően víz/acetonnitril (1:1) arányú keverékében oldottuk fel a mintákat, és a korábbihoz hasonló módon, nitrogén alatt teljesen bekonzentráltuk. A mintákat 150 µl desztillált vízben oldottuk fel a mérések előtt és 12000 fordulat/perc sebességgel 10 percig centrifugáltuk 24 °C-on. Ezt követően a felülúszót 8%-os perklorssavval 1:1 arányban keverve a maradék fehérjét is kicsaptuk, majd az előzőekben leírt centrifugálást ismételtük meg a precipitátum eltávolítása céljából. A minták KIN és KINA tartalmát Agilent 1100 HPLC készülékkel mértük. A KIN esetében UV 365 nm hullámhosszt és 2.3 perces retenciós mérési időt, a KINA esetében pedig 344 nm-es excitációs és 398 nm-es emissziós időt alkalmaztunk, 6 perces retenciós idővel. 100 µl-t töltöttünk a mintákból Hypersil 5 ODS HPLC (150 x 4 mm-es) Thermo-Separation oszlopra, melyet 1 ml/perc áramlási sebességgel mostunk 0.2 M-os zink acetát és 5%-os acetonitril (pH 6.2) oldatával. Az eredményeket a KIN esetében µM-ban a KINA esetében pedig nM-ban adtuk meg.

10.1.11. A lipid anyagcsere vizsgálómódszerei

10.1.11.1. A trombocita membránok fluiditásának meghatározása

A membrán fluiditás mérések Kuhry és mtsai (1985) módszerei szerint történtek. A fényszórási hibák kiküszöbölése céljából a trombocita membrán preparátumok optikai denzitását mindig 0.05 abszorpció egységre állítottuk be hígítással 360, 366 és 368 nm hullámhosszokon, amely a DPH, DPH-PA és a TMA-DPH excitációs hullámhosszainak felelt meg. A fluoreszcens festékeket tetrahidrofuránban hígítottuk fel 1×10^{-3} M-os koncentrációra. A fluoreszcens festékek hígításaiból 5 µl-t adtunk a mintákhoz, melyeket a DPH esetében 30 percig, a TMA-DPH esetében 2 percig, a DPH-PA esetében pedig 10 percig jelöltünk 37 °C-on. A fluoreszcens anizotrópiát számítógép-vezérelt hőmérséklet-szabályzott spektrofluoriméterrel (Hitachi MPF-2A) mértük meg.

A függőlegesen polarizált excitációs fény hullámhossza 360, 366 és 368 nm volt a DPH, DPH-PA és a TMA-DPH festékek esetében, a résátmérő pedig 14 nm-re volt beállítva. A függőlegesen (I_{vv}) és a vízszintesen (I_{vh}) polarizált emissziós fényt 430 nm hullámhosszon olvastuk le 28 nm-es résátmérőnél. Minden egyes minta esetében 10 anizotrópia mérést végeztünk. A fluoreszcens anizotrópiát a következő képlet szerint számítottuk: $R_{ss} = I(vv) - Z \times I(vh) / I(vv) + 2Z \times I(vh)$, amelyben a Z értékét a $Z = I(vv) / I(vh)$ képlet szerint számítottuk és ez 0.92-nek bizonyult. Fluoreszcens festékkel nem jelölt mintákkal is elvégeztük a méréseket azért, hogy a fluoreszcencia intenzitás és az anizotrópia értékeket korrigálni tudjuk a mérések során.

10.1.11.2. A koleszterin és triglicerid szint mérések

A vérminták koleszterin és triglicerid tartalmát enzimatisz módszerekkel, koleszterin

PAP (Diagnosztikum Rt. Magyarország) és GPO-PAP (DIALAB, Ausztria) diagnosztikus reagensekkel, fotometriás módszerrel Hitachi-911 analizátor segítségével végeztük a gyártók utasítása szerint, standardok felhasználásával.

10.1.11.3. A lipidek kivonása a szövetmintákból

A lipideket a máj és a kortikális mintákból Folch és mtsai (1957) módszerével vontuk ki.

10.1.11.4. A konjugált diének és triének mennyiségének meghatározása

A vérplazma és az agyi membránok konjugált dién és trién tartalmának meghatározását izopropanol segítségével végeztük a friss plazma mintákból, és 233 nm hullámhosszon mértük meg a konjugált diének, 277 nm-en pedig a konjugált triének esetében. Az eredményeket a moláris extinkciós koefficiensek segítségével számítottuk ki ($2.8 \times 10^4/\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ a konjugált diének és $2.3 \times 10^4/\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ a konjugált triének esetében).

10.1.11.5. A zsírsavak analízise

A lipidek kivonása a patkány agyi kapilláris frakciókból Folch és mtsai (1957) módszere szerint történt. A zsírsavakat transzmetiláltuk és a keletkezett zsírsav metilésztereket Hitachi 263-80 gázkromatográfyon detektáltuk, amely Hitachi M263 analizátorral volt összekapcsolva. A gázkromatográf hőmérséklete 145-200 °C hőmérséklet-intervallumokra volt beprogramozva, percenként 1 °C hőmérséklet-emelkedéssel. A zsírsav metilésztereket relatív retenciós idejük alapján azonosítottuk be – a standardokhoz képest. A 16:0, 18:1, 20:4, 20:5 és a 22:6 zsírsavak mennyiségét korrekciós számítással határoztuk meg a detektorválasz függvényében.

10.1.11.6. Az eikozanoidok szintézisének mérése

Az agyi mikroereket 37 °C-on 10 percig előinkubáltuk, TC Médium 199-ben. Az enzimreakciót a jelölésre használt [^{14}C]-arachidonsav (3.7 kBq 10 μl abszolút alkoholban) szubsztrát inkubációs elegybe (1 ml) való helyezésével indítottuk el és 10 perccel később, hangyasav hozzáadásával, a pH 3-ra való csökkentésével állítottuk le. A mintákat kétszer 3 ml etilacetáttal extraháltuk. Az organikus fázisokat összegyűjtöttük és nitrogén alatt szárazra pároltuk be. A bepárolt anyagot 150 μl etilacetátban vettük fel és a teljes mennyiséget szilikagél vékonyréteg lemezre cseppentettük fel. A lapok futtatása etilacetát : ecetsav : 2,2,4 trimetilpentán : víz (110:20:30:100) keverék organikus fázisában történt, túlnyomásos vékonyrétegekromatográfia segítségével (Chrompres, Newman Howells, Winchester, Egyesült Királyság). Az eikozanoidokat 15 cm-es futtatási távolságon választottuk szét. A kromatogramokat 3 mm-es csíkonként 5 ml toluol koktéllba (0.4% w/v PPO, 0.02% w/v POPOP és 10% v/v abszolút alkohol) helyeztük és radioaktivitásukat Beckmann LS 1800 folyadékszintillációs készülékkel határoztuk meg. A radioaktív arachidonsav termékeket ánizsaldehid

reagenssel előhívott, jelöletlen standardok segítségével azonosítottuk.

10.1.11.6.1. Magas nyomású folyadék kromatográfia /HPLC/

Fordított fázisú folyadék kromatográfiás készülékkel (RP-HPLC, Isco Mod.2350) 4.6 x 250 mm hosszúságú, Lichrosorb C18 töltetű (7 µm részecske méretű) oszlopon történt az elválasztás. A HETE-k azonosítása UV detektálással és folyadékszcintillációs méréssel történt. A HETE-k szeparálása 255 mM foszforsavat tartalmazó 70%-os acetonitril keverék használatával történt. Az UV meghatározásokat 235 nm-n, 308 UV detektorral (Labor MIM, Magyarország), míg az integrálást Hewlett-Packard integrátorral (HP 3396 A) végeztük.

10.1.12. Statisztikai számítások

A változók eloszlását Kolmogorov-Smirnov teszttel vizsgáltuk. A nem normál eloszlású változók esetében nem-paraméteres próbákat használtunk: Wilcoxon-, Mann-Whitney-, és Kruskal-Wallis teszteket. A normál eloszlású változókat Student-féle *t*-próbával, egy- vagy kétszemponos variancia analízissel (ANOVA) és *post hoc* próbákkal (pl. LSD-, Bonferroni-, Tukey-, Scheffé-, Sidak-tesztek, melyek az adott szignifikancia-szinten tartják az első fajta hiba valószínűségét) vagy χ^2 -próbával és Fisher-féle teszttel hasonlítottuk össze. A változók közötti kapcsolat felderítése céljából pedig Pearson- (paraméteres) és Spearman-féle (nem-paraméteres) korrelációkat számítottunk. Minden esetben a $p=0.05$ értéket tekintettük szignifikancia-határnak. Az allél gyakoriságok demencia rizikóinak meghatározására és összehasonlítására néhány esetben az odds hányadosokat és a 95%-os konfidencia intervallumokat is kiszámítottuk.

A statisztikai számításokhoz Statgrafics, StatXact, Statistica és SPSS számítógépes programcsomagok különböző verzióit használtuk. A transzkriptomikai vizsgálatok adatelemzéséhez a GenePix Pro 3.0 és az Excel számítógépes programokat vettük igénybe.

10.2. A doktori értekezés részét nem képező közlemények listája

1. **Kálmán J**, Juhász A, Bogáts G, Babik B, Rimanóczy A, Janka Z, Penke B, Palotás A. Elevated levels of inflammatory biomarkers in the cerebrospinal fluid after coronary artery bypass surgery are predictors of cognitive decline. *Neurochem. Int.* 2006; 48: 177-180.
2. Bari F, Tóth-Szüki V, Domoki F, **Kálmán J**. Flow motion pattern differences in the forehead and forearm skin: Age-dependent alterations are not specific for Alzheimer's disease. *Microvasc. Res.* 2005; 70: 121-8.
3. Galariotis V, Bódi N, Janka Z, **Kálmán J**. Frontotemporal dementia part III. Clinical diagnosis and treatment. *Clin. Neurosci./Idegy. Szle* 2005; 58: 292-7.
4. Galariotis V, Bódi N, Janka Z, **Kálmán J**. Frontotemporal dementia Part II. Differential diagnosis, genetics, molecular pathomechanism and pathology. *Clin. Neurosci./Idegy. Szle* 2005; 58: 220-4.
5. Galariotis V, Bódi N, Janka Z, **Kálmán J**. Frontotemporal dementia Part I. History, prevalence, clinical forms. *Clin. Neurosci./Idegy. Szle* 2005; 58: 164-71.
6. **Kálmán J**, Palotás A, Bódi N, Kincses TZ, Benedek G, Janka Z, Antal A. Lactate infusion fails to improve semantic categorization in Alzheimer's disease. *Brain Res. Bull.* 2005; 65: 533-9.
7. **Kálmán J**, Palotás A, Kis G, Boda K, Túri P, Bari F, Domoki F, Dóda I, Árgyelán M, Vincze G, Sera T, Csernay L, Janka Z, Pávics L. Regional cortical blood flow changes following sodium lactate infusion in Alzheimer's disease. *Eur. J. Neurosci.* 2005; 21: 1671-8.
8. Szabó Z, Tokaji Zs, **Kálmán J**, Oroszi L, Pestenác A, Janka Z. The effect of bright light exposure on pupillary fluctuations in healthy subjects. *J. Affect. Disord.* 2004; 78: 153-6.
9. Szabó Z, Antal A, Tokaji Z, **Kálmán J**, Kéri Sz, Benedek Gy, Janka Z. Light therapy increases visual contrast sensitivity in seasonal affective disorder. *Psychiatry Res.* 2004; 126: 15-21.
10. Palotás A, Penke B, Kemény L, Janka Z, **Kálmán J**. A chapter in the unity of variety - calcium is the sole author? *Brain Res.* 2004; 1000: 57-9.
11. Palotás A, Penke B, Palotás M, Kenderessy AS, Kemény L, Kis E, Vincze G, Janka Z, **Kálmán J**. Haloperidol attenuates beta-amyloid-induced calcium imbalance in human fibroblasts. *Skin Pharmacol. Physiol.* 2004; 17: 195-9.
12. Csillik B, Janka Z, Boncz I, **Kálmán J**, Mihály A, Vécsei L, Knyihár E. Molecular plasticity of primary nociceptive neurons: relations of the NGF-c-jun system to neurotomy and chronic pain. *Ann. Anat.* 2003; 185: 303-14.

13. Palotás A.-Janka Z, Penke B, **Kálmán J.** Risperidon antagonizálja a β -amyloid peptid okozta intracelluláris kalcium-szint változásokat fibroblasztokon. *Neuropsychopharmacol. Hung.* 2003; 5: 138-42.
14. **Kálmán J,** Juhász A, Rimanóczy A, Palotás A, Palotas M, Boda K, Marki-Zay J, Csibri E, Janka Z. The nitric oxide synthase-3 codon 298 polymorphism is not associated with late-onset sporadic Alzheimer's dementia and Lewy body disease in a sample from Hungary. *Psychiatr. Genet.* 2003; 13: 201-4.
15. **Kálmán J,** Boda K, Bende Zs, Janka Z. Demencia szindrómák szűrése: A 7-Perces-Teszt magyarországi alkalmazása. *Orv. Hetil.* 2003; 144: 1929-38.
16. Juhász A, Rimanóczy Á, **Kálmán J,** Csibri É, Dibó Gy, Majtényi K, Janka Z. Genetikai polimorfizmusok különféle eredetű demencia állapotokban. *Neuropsychopharmacol. Hung.* 2003; 5: 4-12.
17. Palotás A, **Kálmán J,** Palotás M, Kemény L, Janka Z, Penke B. Long-term exposition of cells to beta-amyloid results in decreased intracellular calcium concentration. *Neurochem. Int.* 2003, 42: 543-7.
18. Palotás A, **Kálmán J,** Palotás M, Matin K, Szentpali K, Paszt A, Janka Z, Penke B. Whole blood samples from Alzheimer patients and control donors demonstrate fluorimetric differences. *Neurochem. Res.* 2002; 27: 1581-3.
19. Palotás A, **Kálmán J,** Laskay G, Juhász A, Janka Z, Penke B. Beta-amyloid peptid okozta intracelluláris calcium szint változások Alzheimer kóros betegek fibroblasztjain. *Clin. Neurosci./Idegy. Szle* 2002; 55: 164-7.
20. Palotás A, **Kálmán J,** Palotás M, Juhász A, Janka Z, Penke B. Fibroblasts and lymphocytes from Alzheimer patients are resistant to beta-amyloid-induced increase in the intracellular calcium concentration. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 2002; 26: 971-4.
21. Boda K, **Kálmán J,** Janka Z. Application of repeated measurement ANOVA models using SAS and SPSS: Examination of the effect of intravenous lactate infusion in Alzheimer's disease. *Stud. Health Technol. Inform.* 2002; 90: 437-8.
22. Palotás A, **Kálmán J,** Palotás M, Juhász A, Janka Z, Penke B. Beta-amyloid-induced increase in the resting intracellular calcium concentration gives support to tell Alzheimer lymphocytes from control ones. *Brain Res. Bull.* 2002; 58: 203-5.
23. Antal A, Kéri Sz, Kincses T, **Kálmán J,** Dibó G, Benedek Gy, Janka Z, Vécsei L. Corticostriatal circuitry mediates fast-track visual categorization. *Brain Res. Cogn. Brain Res.* 2002; 14: 53-9.
24. **Kálmán J,** Szakács R, Török T, Rózsa Z, Barzó P, Rudas L, Papp JG, Janka Z. Decreased cutaneous vasodilatation to isometric handgrip exercise in Alzheimer's disease. *Int. J. Geriatr. Psychiatry* 2002; 7: 371-4.
25. Janka Z, Juhász A, Rimanóczy Á, Boda K, Marki-Zay J, **Kálmán J.** Codon 311 (Cys --> Ser) polymorphism of paraoxonase-2 gene is associated with apolipoprotein E4 allele in both Alzheimer's and vascular dementias. *Mol. Psychiatry* 2002; 7: 110-2.

26. Janka Z, Juhász A, Rimanóczy A, Boda K, Márki-Zay J, Palotás M, Kuk I, Zöllei M, Jakab K, **Kálmán J**. Alpha2-macroglobulin exon 24 (Val-1000-Ile) polymorphism is not associated with late-onset sporadic Alzheimer's dementia in the Hungarian population. *Psychiatr. Genet.* 2002; 12: 49-54.
27. Mórocz M, **Kálmán J**, Juhász A, Sinkó I, Downes S, Janka Z, Raskó I. Elevated levels of oxidative DNA damage in lymphocytes from Alzheimer's disease patients. *Neurobiol Aging* 2002; 23: 47-53.
28. Szakács R, **Kálmán J**, Szili-Török T, Rudas L, Janka Z. Perifériás vasoregulációs eltérések Alzheimer-dementiában. *Clin. Neurosci./Ideggy. Szle* 2001; 54: 285-8.
29. Szakács R, **Kálmán J**, Juhász A, Laird G, Dickens P, Janka Z. Szérum és liquor interleukin-6 szintek vizsgálata Alzheimer betegségben, valamint demens és nem demens Down-kóros személyeknél. *Neuropsychopharmacol. Hung.* 2001; 3: 125-30.
30. Szili-Török T, **Kálmán J**, Paprika D, Dibó Gy, Rózsa Zs, Rudas L. Depressed baroreflex sensitivity in patients with Alzheimer's disease and Parkinson disease. *Neurobiol. Aging* 2001; 22: 435-8.
31. Jakab K, Novák Z, Engelhardt J, Kemény L, **Kálmán J**, Vécsei L, Raskó I. UVB irradiation-induced apoptosis increased in lymphocytes of Huntington's disease patients. *Neuroreport* 2001; 12: 1653-6.
32. Palotás A, **Kálmán J**, Laskay G, Juhász A, Janka Z, Penke B. Comparative studies on $[Ca^{2+}]_i$ -level of fibroblasts from Alzheimer patients and control individuals. *Neurochem. Res.* 2001; 26: 817-20.
33. Kéri Sz, **Kálmán J**, Kelemen O, Benedek Gy, Janka Z. Are Alzheimer's patients able to learn visual prototypes? *Neuropsychologia* 2001; 39: 1218-23.
34. **Kálmán J**, Juhász A, Rimanóczy Á, Majtényi K, Jakab K, Gárdián G, Raskó I, Janka Z. Increased apolipoprotein E4 allele frequency is associated with Pick's dementia, but not with Huntington's disease. *Neurobiol. Aging* 2000; 21: 555-8.
35. **Kálmán J**, Márki-Zay J, Juhász A, Sántha A, Dux L, Janka Z. Serum and cerebrospinal fluid cystatin C levels in vascular and Alzheimer's dementia. *Acta Neurol. Scand.* 2000; 101: 279-82.
36. **Kálmán J**, Parry-Jones WLI, McGuinness D, Vetró Á. Before the year 2000: Survey of undergraduate teaching of child and adolescent psychiatry in European medical schools. *Eur. J. Child Adolesc. Psychiatry* 2000; 9: 139-43.
37. Kéri Sz, **Kálmán J**, Rapcsák S, Antal A, Benedek Gy, Janka Z. Classification learning in Alzheimer's disease. *Brain* 1999; 122: 1063-8.
38. **Kálmán J**, Janka Z. Az Alzheimer-kór farmakoterápiája: *MOTESZ Magazin* 1999; 4-5: 8-16.
39. Kéri Sz., Antal A., **Kálmán J**, Janka Z., Benedek Gy. Visual contrast sensitivity and

- scotopic evoked potential in Alzheimer's disease: An evidence of magnocellular deficit. *Vision Res.* 1999; 39: 2261-5.
40. Kéri Sz, **Kálmán J**, Janka Z, Benedek Gy, Rapcsák I. Dissociability within the category learning domain: evidence for implicit category exemplar acquisition. *Neurobiology* 1998; 6: 211-2.
41. Van Beinum ME, McGuinness D, Csík V, **Kálmán J**, Parry-Jones WLI, Vetró Á. Contrasting child and adolescent psychiatry services in Szeged, Hungary, and Glasgow, Scotland. *Eur. Child Adolesc. Psychiatry* 1998; 2: 105-13.
42. Zsurka G, **Kálmán J**, Császár A, Raskó I, Janka Z, Venetianer P. No mitochondrial haplotype was found to increase risk for Alzheimer's disease. *Biol. Psychiatry* 1998; 44: 371-3.
43. McConathy WJ, Lackó AG, **Kálmán J**, Zachariah NY. Senile dementia and sex hormone binding globulin. *Clin. Chem.* 1997; 43: S110.
44. Császár A, **Kálmán J**, Szalai Cs, Janka Z, Romics L. Association of the apolipoprotein A-IV codon 360 mutation with Alzheimer's disease. *Neurosci. Lett.* 1997; 230: 151-4.
45. **Kálmán J**, Juhász A, Laird G, Dickens P, Járdánházy T, Rimanóczy Á, Boncz I, Parry-Jones WLI, Janka Z. Serum interleukin-6 levels correlate with the severity of dementia in Down syndrome and Alzheimer's disease. *Acta Neurol. Scand.* 1997; 96: 236-40.
46. **Kálmán J**, Kanka A, Maglóczy E, Szőke A, Járdánházy T, Janka Z. Increased mydriatic response to tropicamide as a sign of cholinergic hypersensitivity in dementias. *Biol. Psychiatry* 1997; 41: 909-11.
47. **Kálmán J**, Juhász A, Kanka A, Szekeres Gy, Janka Z. Központi idegrendszer ellenes antitestek vizsgálata schizophren betegekben. *Psychiat. Hung.* 1997; 12: 201-8.
48. **Kálmán J**, Engelhardt JE, Le WD, Kása P, Kovács I, Appel SH. Experimental immune-mediated damage to the septal cholinergic structures and its effect on learning and memory functions. *J. Neuroimmunol.* 1997; 77: 63-74.
49. **Kálmán J**, Járdánházy T, Cserhádi A, Szekeres Gy, Demeter I, Berek I, Dobranovics I, Csernay L, Janka Z. Prion demenciák: A Creutzfeldt-Jakob betegség spektrum nozológiája és diagnosztikus nehézségei. *Orv. Hetil.* 1997; 12: 731-7.
50. Cserhádi A, **Kálmán J**, Milassin P, Csernay L. A Creutzfeldt-Jakob betegség radiológiai diagnózisa. *Magy. Radiol.* 1996; 5: 136-9.
51. Janka Z, Maglóczy E, Józsa K, Gulácsy É, Somogyi A, Kanka A, **Kálmán J**, Tamás L. Kognitív hanyatlás és demencia tájékozódó vizsgálata dél-kelet magyarországi szociális otthonokban. *Psychiat. Hung.* 1996; 11: 363-73.
52. **Kálmán J**, Kanka A, Maglóczy E, Szőke A, Járdánházy T, Janka Z. Kolinerg hiperszenzitivitás pupillometriás vizsgálata Alzheimer demenciában. *Psychiat. Hung.* 1996; 11: 445-50.
53. **Kálmán J**, Maglóczy E, Janka Z. A chiralitás orientáció vizsgálata demenciában. *Clin. Neurosci./Ideggy. Szle* 1995; 48: 177-82.

54. **Kálmán J**, Maglóczky E, Janka Z. Az óra rajzolási teszt: egy gyors és egyszerű demencia zűrő módszer. *Psychiat. Hung.* 1995; 1: 11-8.
55. **Kálmán J**, Maglóczky E, Janka Z. Disturbed visuo-spatial orientation in the early stage of Alzheimer's dementia. *Arch. Gerontol. Geriat.* 1995; 21: 27-34.
56. Vetró Á, **Kálmán J**, Szűcs P. Description of general services for people with a mental handicap. *J. Intell. Disab. Res.* 1993; 37: (Suppl.- 1): 39-41.
57. Rimanóczy Á, **Kálmán J**, Szekeres Gy, Boda K, Janka Z. Biológiai markerek vizsgálata krónikus alkoholizmusban: II. Limfociták B-adrenerg-receptor működése. *Clin. Neurosci./Ideggy. Szle* 1991; 44: 311-7.
58. **Kálmán J**, Rimanóczy Á, Szekeres Gy, Boda K, Janka Z. Biológiai markerek vizsgálata krónikus alkoholizmusban: I. Trombocita monoamino oxidáz-B aktivitás és szíálsav tartalom. *Clin. Neurosci./Ideggy. Szle* 1991; 44: 303-9.
59. Janka Z, Somogyi A, Maglóczky E, Pákáski M, **Kálmán J**. Demencia szűrővizsgálat cognitív gyors teszt segítségével. *Orv. Hetil.* 1988; 129: 2797-2800.

10.3. Tudománymetriai adatok, statisztikák

	Rész adat	Összesen
TUDOMÁNYOS ELŐADÁSAI		
Kongresszusi előadások száma	-----	153
TUDOMÁNYOS KÖNYVEK, KÖNYVFEJEZETEK		
Szakkönyvek száma (összesen)	-----	0
Idegen nyelvű	0	-----
Magyar nyelvű	0	-----
Könyvfejezetek száma (összesen)	-----	8
Idegen nyelvű	4	-----
Magyar nyelvű	4	-----
Szerkesztett könyvek száma (összesen)	-----	0
Idegen nyelvű	0	-----
Magyar nyelvű	0	-----
Tankönyvek száma (összesen)	-----	0
Pályázó által írt tankönyvek száma	0	-----
Pályázó által szerkesztett tankönyvek száma	0	-----
Tankönyv fejezetek (összesen)	-----	4
TUDOMÁNYOS KÖZLEMÉNYEK SZÁMA		
Lektorált szakfolyóiratokban megjelent tudományos közlemények száma	-----	98
Ebből első vagy utolsó szerzőként	67	-----
Nemzetközi folyóiratban	71	-----
Hazai idegennyelvű folyóiratban	0	-----
Hazai magyar nyelvű folyóiratban	27	-----
Szerkesztői levelek, hozzászólások, válaszok száma	1	-----
Kongresszusi előadások folyóiratban vagy könyvben	-----	84
Külföldi folyóiratban	27	-----
Magyar folyóiratban	57	-----
Folyóiratban megjelent absztraktok száma	-----	84
SZAKFOLYÓIRATOKBAN MEGJELENT TUDOMÁNYOS KÖZLEMÉNYEINEK MINŐSÍTÉSE		
Valamennyi eredeti közleményeinek összegzett impakt faktora (absztraktok és nem lektorált levelek nélkül)	-----	173.501
Az utolsó 10 év éves átlaga	16.913	-----
A PhD vagy kandidátusi disszertációban <i>nem szereplő</i> közlemények impakt faktor összege	166.604	-----
TUDOMÁNYOS KÖZLEMÉNYEINEK IDÉZETTSÉGE		
Idézettség összesen	-----	317
(ebből önidézés)	0	-----